

**Analyse biologischer Effekte eines
Fibroblasten-Wachstumsfaktor-bindenden
Proteins (FGF-BP) in Tumoren über
verschiedene Knockdown-Strategien**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Daniel Schulze

aus Marburg/Lahn

Marburg/Lahn 2011

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Kissel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Achim Aigner

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Juli .2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Achim Aigner in der Zeit vom Juni 2006 bis Juli 2010 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

*Wir sollten das messbare messen und
das nicht messbare nicht ignorieren*

Albert Einstein

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	KREBSERKRANKUNGEN	1
1.2	MOLEKULARE MECHANISMEN DER TUMORENTSTEHUNG.....	2
1.3	INVASIVITÄT, METASTASIERUNG UND ANGIOGENESE	3
1.4	ANTIANGIOGENE THERAPEUTIKA	4
1.5	BIOLOGIE DES KOLOREKTALEN KARZINOMS (CRC).....	4
1.6	BIOLOGIE DES ZERVIXKARZINOMS	6
1.7	TUMORMARKER UND QUANTIFIZIERUNG DER GENEXPRESSION.....	6
1.8	KREBSTHERAPIE UND ANTITUMORMITTEL	8
1.9	RESISTENZEN GEGENÜBER CHEMOTHERAPIE.....	9
1.10	TUMORMODELLE UND ZELLMATRIXKOMponentEN.....	9
1.11	WACHSTUMSFAKTOREN UND FGFs	11
1.11.1	<i>Struktur und Wirkmechanismus der FGFs</i>	11
1.11.2	<i>Lokalisation und Freisetzung von FGFs</i>	13
1.12	FGF-BP.....	14
1.12.1	<i>Strukturelle Charakterisierung.....</i>	14
1.12.2	<i>Die FGF-BP-Proteinfamilie.....</i>	15
1.12.3	<i>FGF-BP-Expression in Normalgewebe und Neoplasien</i>	16
1.12.4	<i>Regulation der FGF-BP-Expression</i>	17
1.12.5	<i>Wirkmechanismus und Interaktionspartner.....</i>	18
1.12.6	<i>Biologische Effekte von FGF-BP</i>	19
1.13	HMG-PROTEINE	22
1.14	METHODEN DER STUMMSCHALTUNG VON GENEN.....	23
1.15	RNA INTERFERENZ (RNAi).....	24
1.15.1	<i>Mechanismus der RNAi.....</i>	24
1.15.2	<i>Vektorbasierte RNAi.....</i>	26
1.15.3	<i>RNAi-basierte Krebstherapie und gentherapeutische Strategien.....</i>	26
1.16	ALLGEMEINES ZU REKOMBINANTEN EXPRESSIONSSYSTEMEN	28
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	30
3	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	LABORGERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	31
3.1.1	<i>Kits, Marker, rekombinante Proteine und Enzymsubstrate</i>	31
3.1.2	<i>Chemikalien und Chemotherapeutika.....</i>	32
3.1.3	<i>Antikörper.....</i>	32
3.1.4	<i>Oligonukleotide und Vektoren</i>	33
3.1.5	<i>Standardlösungen, Puffer und Antibiotika.....</i>	37
3.1.6	<i>Gewebekulturmedien und Seren</i>	37

3.1.7	Zelllinien und Wirtsstämme (Bakterien/Hefen)	38
3.1.8	Versuchstiere	38
3.2	METHODEN	39
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	39
3.2.1.1	Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von DNA	39
3.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	39
3.2.1.3	Aufreinigung von genomischer DNA	39
3.2.1.4	Aufreinigung von Plasmiden (Mini- und Großpräparation)	40
3.2.1.5	RNA-Präparation aus Gewebe und Zellkultur	40
3.2.1.6	Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	40
3.2.1.7	Colony-PCR (Screening nach rekombinanten Klonen)	41
3.2.1.8	Amplifikation von RNA (RT-PCR) und PCR aus gDNA.....	41
3.2.1.9	Präparative PCR.....	43
3.2.1.10	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	43
3.2.1.11	Herstellung radioaktiver Sonden und Southern blotting.....	44
3.2.1.12	DNA Sequenzierung	44
3.2.2	Statistische Methoden	45
3.2.3	Software und Internet-Ressourcen.....	45
3.2.4	Rekombinante Expression und Reinigung von Proteinen	46
3.2.4.1	Arbeiten mit E. coli.....	46
3.2.4.2	Arbeiten mit Sf-9 Insektenzellen	47
3.2.4.3	Arbeiten mit Pichia pastoris	48
3.2.4.4	Affinitätsreinigung über Glutathion-Sepharose	50
3.2.4.5	Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose.....	51
3.2.4.6	Affinitätsreinigung über Heparin-Sepharose	52
3.2.4.7	Affinitätsreinigung von Anti-FGF-BP _T -Antikörpern.....	52
3.2.5	Proteinchemische und immunchemische Methoden	53
3.2.5.1	Präparation von Proteinextrakten aus Zellen und Gewebe	53
3.2.5.2	Probenkonzentrierung und Umpufferung	53
3.2.5.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	53
3.2.5.4	Dot blotting	54
3.2.5.5	SDS-PAGE und Western blotting	54
3.2.5.6	Handhabung und Färbung von Gelen	56
3.2.5.7	Antikörper-Nachweis, Visualisierung und Quantifizierung des Signals.....	56
3.2.5.8	[¹²⁵ I]-Markierung von Proteinen	57
3.2.5.9	Liganden-Dot blots und Far-Western	57
3.2.5.10	Charakterisierung von Protein-DNA-Bindung (South-Western blot).....	58
3.2.5.11	In vitro-Stabilitätsuntersuchung von FGF-BP	58
3.2.5.12	Expressionsanalysen mit Antibody-Arrays.....	58
3.2.5.13	Apoptose-Assays (Caspase 3/7-Aktivitätstests)	59

3.2.6	<i>Methoden in der Zellkultur und in vivo-Modelle</i>	60
3.2.6.1	Allgemeine Methoden.....	60
3.2.6.2	Kultivierung und Konservierung	60
3.2.6.3	Stabile und transiente Transfektion von DNA	60
3.2.6.4	Selektion auf stabile Expression und Isolierung resistenter Klone	61
3.2.6.5	Bestimmung der Geneticintoleranzdosis	61
3.2.6.6	Zellzyklusmessung und Durchflußzytometrie (FACS).....	62
3.2.6.7	Methoden zur Verminderung der FGF-BP-Expression:	
	Ribozym-targeting.....	63
3.2.6.8	Transfektion von siRNAs	63
3.2.6.9	Tet-on-System und vektorbasiertes FGF-BP-targeting (shRNA-Expressionsvektoren).....	64
3.2.6.10	In vivo-Transfektion von PEI/siRNA-Komplexen	65
3.2.6.11	In vivo-Wachstumskinetik von humanen Tumorxenotransplantaten.....	65
3.2.6.12	Soft-Agar Proliferationsassay	66
3.2.6.13	Wachstumsassays mit WST-1	67
3.2.6.14	Bestimmung von Zytotoxizitäten und Erstellen von Dosis-Wirkungskurven.....	67
4	ERGEBNISSE	68
4.1	SERUMABHÄNGIGKEIT DER FGF-BP EXPRESSION	68
4.2	FGF-BP-TARGETING-STRATEGIEN IM VERGLEICH.....	69
4.2.1	siRNA-vermitteltes FGF-BP-targeting.....	69
4.2.2	Stabiler FGF-BP-knockdown mit shRNAs und Regulierbarkeit durch das Tet-on System	70
4.2.3	shRNA-Expressionsvektor verbleibt nach klonaler Selektionierung nicht stabil im Genom	71
4.3	FGF-BP UND PROLIFERATION.....	72
4.3.1	Proliferationsfördernder Effekt von FGF-BP auf nicht-tumorigene COS-7-Zellen.....	72
4.3.2	Synergistischer Effekt von FGF2 bei Koexpression mit FGF-BP.....	73
4.3.3	FGF-BP-knockdown wirkt antiproliferativ	74
4.3.4	FGF-BP-Depletion führt zu Alterationen im Zellzyklus.....	76
4.3.5	Antitumoraler Effekt eines FGF-BP-knockdowns im Nacktmausmodell.....	77
4.4	ANTI-APOPTOTISCHER EFFEKT VON FGF-BP	79
4.4.1	Apoptose-Induktion nach stabilem FGF-BP-knockdown	79
4.4.2	Apoptose-Rescue: stabile FGF-BP-Überexpression verringert Caspaseaktivität	79
4.5	IDENTIFIZIERUNG RELEVANTER PATHWAYS IM FGF-BP-SIGNALING.....	81
4.5.1	FGF-BP-vermittelte Alterationen von MAP-Kinasen in der FGF-BP-Signaltransduktion.....	81
4.5.2	FGF-BP abhängige Modulation von Apoptosemarkern und Zellzyklusregulatoren.....	83
4.6	EINFLUSS DER FGF-BP-EXPRESSION AUF DIE SENSITIVITÄT GEGENÜBER ZYTOSTATIKA	85
4.6.1	Zellzyklus-abhängige Chemotherapeutika	85
4.6.2	Zellzyklus-unabhängige Chemotherapeutika	87

4.7	ETABLIERUNG DER FGF-BP EXPRESSION UND OPTIMIERUNGSSTRATEGIEN IN VERSCHIEDENEN WIRTSORGANISMEN	89
4.7.1	<i>Arbeiten in P. pastoris: Aufrechterhalten des Selektionsdrucks ist erforderlich für eine rekombinante Expression</i>	90
4.7.2	<i>Proteinproduktion sowie Koexpression mit Fusionspartnern in E. coli</i>	91
4.8	AUFFINDEN NEUER INTERAKTIONSPARTNER VON FGF-BP	94
4.8.1	<i>FGFs</i>	94
4.8.2	<i>HMGA</i>	95
4.8.3	<i>Nukleinsäuren (DNA)</i>	95
4.9	STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN UND DNA-BINDUNG.....	96
4.9.1	<i>Thermische Instabilität von FGF-BP</i>	96
4.9.2	<i>Degradation von FGF-BP verläuft Protease-unabhängig</i>	96
4.9.3	<i>Genomische DNA stabilisiert FGF-BP</i>	96
5	DISKUSSION	98
5.1	GENTHERAPEUTISCHE ÜBERLEGUNGEN UND VERGLEICH VERSCHIEDENER FGF-BP-TARGETING STRATEGIEN	98
5.2	BIOLOGISCHE EFFEKTE EINER FGF-BP-DEPLETION SIND ABHÄNGIG VON DER KINETIK DES KNOCKDOWNS.....	101
5.3	KOMPLEXE KONTROLLMECHANISMEN: REGULATION DER FGF-BP-EXPRESSION DURCH SERUM.....	103
5.4	EINFLUSS DES TET-ON-SYSTEMS AUF DIE EXPRESSION VON shRNAs GEGEN FGF-BP	105
5.5	FGF-BP ALS POTENTIELLES TARGET IN DER TUMORTHERAPIE: BIOLOGISCHE RELEVANZ EINER FGF-BP-DEPLETION.....	109
5.6	NEUE FGF-BP-BINDEPARTNER UND AUSWEITUNG DER BIOLOGISCHEN FUNKTION VON FGF-BP.....	116
6	ZUSAMMENFASSUNG	119
7	SUMMARY	121
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	123
9	LITERATURVERZEICHNIS	125
10	PUBLIKATIONEN UND TEILNAHME AN KONGRESSEN	141
10.1	LISTE EIGENER PUBLIKATIONEN.....	141
10.2	TEILNAHME AN KONGRESSEN UND POSTER-PRÄSENTATIONEN	141
11	CURRICULUM VITAE	142
12	DANKSAGUNG	143
13	ERKLÄRUNG	144

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

Jährlich erkranken in der Bundesrepublik etwa 450.000 Menschen an Krebs, über 215.000 Menschen sterben jährlich daran. Damit stehen die bösartigen Gewebeneubildungen in Deutschland mit ~25% nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems an zweiter Stelle in der Häufigkeit der Todesursachen [1]. Es ist damit zu rechnen, dass jeder dritte Deutsche im Laufe seines Lebens von einer Krebserkrankung betroffen ist.

Maligne Tumore zeichnen sich durch eine vermehrte sowie autonome Proliferation von Körperzellen aus, welche zumeist invasiv-destruierend physiologische Barrieren durchbrechen und in gesundes Nachbargewebe einwachsen. Metastasierendes Wachstum liegt vor, sofern weitere Organe befallen sind. Bei der Karzinogenese handelt es sich um ein monoklonales Ereignis. Dies beinhaltet, dass die genetische Schädigung irreversibel im Genom verankert ist und damit an *alle* Tochterzellen vererbt wird. Nach Hanahan und Weinberg liegt malignes Wachstum vor, sofern eine Zelle nachfolgend genannte Charakteristika aufweist (sog. „*Hallmarks of Cancer*“) [2]:

- Unabhängigkeit von Proliferationssignalen
- Umgehung der Apoptose
- Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- unendliches „replikatives Potential“ (*i.e.* Resistenz gegenüber Seneszenz)
- Invasion und Destruktion
- Metastasierung
- Fähigkeit zur Angiogenese

Die pathobiologische Erfassung der Neoplasie erfolgt durch die Ermittlung der Herkunft sowie Lokalisation des entarteten Gewebes. Auf makroskopischer Ebene wird eine Einteilung der Tumorigenität und -größe über die TNM-Klassifikation nach dem sog. *Staging* vorgenommen (Stadieneinteilung nach der UICC, *International Union against Cancer* sowie AJCC, *American Joint Committee on Cancer*) [3]. Um die molekularen Veränderungen im Erbgut einer Tumorzelle herauszuarbeiten, werden diese Befunde durch genetische Analysen gestützt. So sind beispielsweise die Untersuchung auf Mutation von *TP53* [4], Ermittlung des Rezeptorstatus (insbesondere bei hormonabhängigen Tumoren) sowie die Quantifizierung der Expressionslevel von Effluxpumpen (z.B. P-gp) und Apoptosemarkern (z.B. Bcl-2 oder Bax) gängige Operationen, um die Erkrankung molekular-pathologisch genauer zu charakterisieren (näheres dazu in Abschnitt 1.2).

1.2 Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung

Das allgemein anerkannte Mehrschrittmmodell der Karzinogenese geht davon aus, dass ein Tumor im Laufe seiner Entwicklung vor der Malignität verschiedene Stadien durchlaufen muss, bis er klinisch manifest wird [5]. Aufgrund der genetischen Instabilität akkumulieren die entarteten Zellen zunächst in einer primären Phase eine Reihe von Veränderungen (Mutationen) im Erbgut (Initiation). Als Folge dieser Schädigung entstehen weitere, sekundäre Mutationen (Promotion). Erst in der letzten Phase der Transformation (Progression) wird der maligne Phänotyp eines bösartigen Tumors erreicht. Bisweilen kann zwischen primärer Entartung und Diagnose der Erkrankung eine symptomlose Latenzzeit von mehreren Jahren liegen (zur Übersicht [6]).

Lebensdauer, Zellteilung und Wachstumsgeschwindigkeit einer Zelle werden durch hierarchisch fein regulierte Abläufe gesteuert. Während die physiologisch gesunde Zelle in einem ausbalancierten System adäquat auf Stimulations- sowie Inhibitionssignale reagieren kann, ist die Tumorzelle diesen Regulationsprozessen gegenüber resistent und unterliegt einer autonomen Funktionsweise. Kennzeichnend für die neoplastische Transformation ist ein Ungleichgewicht zwischen der Expression von Onkogenen und natürlichen Tumorsuppressoren. Jede gesunde Zelle enthält physiologische Vorstufen der Onkogene, sog. Proto-Onkogene. Diese kodieren für essentielle Regulatorproteine, die beispielsweise eine Zellteilung sowie DNA-Replikation fördern. Eine konstitutive Aktivierung der Proto-Onkogene infolge einer aktivierenden *gain-of-function*-Mutation macht sie zu Onkogenen (z.B. Überexpression in der Ras-Raf-MEK-Kaskade [7]). Die biologische Umwandlung des Proto-Onkogens in ein krebserzeugendes Onkogen ist auf die Aktivität von Karzinogenen zurückzuführen. Karzinogene werden klassifiziert hinsichtlich Art, Wirkweise und Herkunft in chemische Substanzen (z.B. Zigarettenrauch, Asbest, primäre aromatische Amine, Aflatoxine), ionisierende Strahlung (z.B. Radioaktivität, UV-Licht) sowie Tumorpromotoren viralen Ursprungs (z.B. Retro- oder humane Papilloma-Viren). Die Wirkung der Tumorsuppressorgene ist der von Onkogenen entgegengerichtet. Sie begrenzen das Wachstum, induzieren Ruhephasen, aktivieren DNA-Reparaturmechanismen und lösen Apoptose aus. Dabei ist insbesondere der Transkriptionsfaktor p53 zu nennen. Bei 50% aller Tumore ist eine Schädigung im *TP53*-Gen beschrieben (zur Übersicht [8-10]). Weitere relevante Tumorsuppressorgene, bei welchen eine *loss-of-function*-Mutation bzw. Deletion zu einem Funktionsverlust und damit zu gesteigertem Tumorwachstum führen, sind das *RBI*- (Retinoblastom-), *PTEN*- (*Phosphatase and Tensin homolog*), das *DCC*- (*deleted in colorectal carcinoma*) sowie das bei der DNA-Reparatur wichtige *BRCA1*-Gen. Auf das sog. *APC*-Gen wird näher in Abschnitt 1.5 eingegangen, da es bei kolorektalen Karzinomen eine besondere Rolle spielt. Während Tumorsuppressorgene vorherrschend rezessiv vererbt werden und daher eine Mutation beider Allele notwendig ist, reicht bei Onkogenen zumeist die Mutation eines Allels aus, um eine Transformation herbeizuführen (zur Übersicht [11]).

1.3 Invasivität, Metastasierung und Angiogenese

Der Unterschied zwischen malignem und benignem Wachstum ist die Kompetenz der Tumorzellen zur Metastasenbildung. 90% aller durch Krebs verursachten Todesfälle sind auf eine Streuung des Primärtumors zurückzuführen [12]. Die sog. metastatische Kaskade beginnt mit der Abdissoziation der entarteten Zellen vom primären Tumorverband. Nach Invasion in das umgebende Gewebe penetrieren diese in das Gefäßsystem (Intravasation), wodurch eine systemische Distribution im Organismus erfolgt. Nach der anerkannten „seed and soil“-Hypothese von Stephen Paget vollzieht sich die Zirkulation durch Blut- (hämatogen) bzw. Lymphgefäße (lymphogen) solange, bis der Tumor ein geeignetes Milieu vorfindet, um an einem neuen Ort weiterzuwachsen [13]. Protein-Protein- (z.B. via Cadherine) bzw. Protein-Matrix-Interaktionen (z.B. via Integrine) vermitteln eine Adhäsion der Tumorzelle an die Endothelschicht der sekundär betroffenen Organe. Tumorspezifische Proteasen (insbesondere MMPs, *Matrix Metalloproteases*) katalysieren die Freilegung der Basalmembran, so dass die Zellen das Gefäßsystem wieder verlassen können (Extravasation) und sich in dem befallenen Bindegewebe ein sekundärer Tumor (sog. Fernmetastase) ausbildet (zur Übersicht [14, 15]).

Invasivität und neoplastisches Wachstum gehen zwangsläufig mit der Neubildung eines Kapillarnetzwerks einher und die Sicherstellung einer einwandfreien Blutversorgung ist Voraussetzung für einen malignen Phänotyp [16, 17]. Da die alleinige Diffusion von Nährstoffen den erhöhten Energiebedarf von entarteten Zellen nicht dauerhaft decken kann, stellt die Ausbildung eines eigenen Gefäßsystems, die sog. Angiogenese, einen essentiellen Prozeß für solide Tumore dar.. Der Prozeß wird durch die Sekretion spezifischer, pro-angiogener Signalmoleküle reguliert. Dabei spielt der Wachstumsfaktor VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) eine wichtige Rolle, da er eine ausreichende Durchblutung des entarteten Gewebes sicherstellt. Als Folge einer hypoxischen Situation wird VEGF verstärkt gebildet. Dadurch steigt die Kapillarpermeabilität an und es können vermehrt Endothelzellen neuer Gefäße in die hypoxischen Gebiete aussprossen. Darüber hinaus sind weitere Wachstumsfaktoren, im speziellen die FGFs (*Fibroblast Growth Factors*), als wichtige Regulatoren an der Vaskulo- sowie Angiogenese beteiligt (zur Übersicht [18]). Die Mitglieder beider Proteinfamilien stehen über mechanistisch eng verknüpfte Signalwege miteinander in Kontakt. Beispielsweise ist beschrieben, dass VEGF durch FGF2 hochreguliert wird [19, 20]. Somit agieren beide synergistisch als Angiogenesefaktoren [21, 22]. Bei der Angiogenese spielen die MAP(*Mitogen-activated Protein*)-Kinasen eine wichtige Rolle. Die MAPK ERK (*Extracellular Signal-regulated Kinase*) induziert eine Gefäßneubildung durch eine HIF(Hypoxie-induzierbarer Faktor)-induzierte Hochregulation¹ von VEGF

1) HIF kontrolliert die Expression von mehr als hundert verschiedenen Genen, die in Angiogenese, Zellteilung, zelluläres Überleben (*Survival*) und Glucoseverwertung involviert sind. HIF ist für VEGF der wichtigste Transkriptionsfaktor (zur Übersicht [23, 24]).

[25], ist aber ebenfalls für eine FGF2-vermittelte Angiogenese verantwortlich [26]. Die in dieser Arbeit untersuchten LS174T-Zellen weisen eine hohe VEGF-Expression auf [27] und sprechen gut auf eine Anti-VEGF-Therapie an [28]. Weitere pro-angiogene Signalstoffe sind TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), TNF (*Tumor Necrosis Factor*), Angiopoietine und EGF (*Epidermal Growth Factor*). Die körpereigenen antiangiogenen Faktoren wie Interferone, IL-10 oder TIMP-1 (*Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinases-1*) werden nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

1.4 Antiangiogene Therapeutika

Folkman stellte erstmals die Hypothese auf, dass durch Hemmung der Angiogenese die Progression des Tumors stark aufgehalten werden kann [29]. Da *ein* Kapillargefäß mit einer Endothelzelle hundert Tumorzellen versorgt, liegt der Schluß nahe, dass allein durch eine Inhibition der Endothelzelle das Wachstum eines Tumors massiv beeinträchtigt ist. Das erste in der antiangiogenen Therapie verwendete Arzneimittel ist der 2005 zugelassene monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab². Bestrebungen VEGF durch Blockade an seinem Rezeptor (VEGFR) zu inhibieren, befinden sich ebenfalls seit über einem Jahrzehnt im Fokus klinischer Studien. Dazu stehen Ramucirumab, der Multi-Tyrosinkinase Inhibitor Pazopanib sowie der „lösliche“ VEGF-Rezeptor Aflibercept (VEGF-*Trap*) zur Verfügung³. Weitere Schwerpunkte antiangiogener Strategien liegen in der Erforschung von Lipidmediatoren (beispielsweise des Sphingolipids Sphingosin-1-Phosphat S1P), Heparanaseinhibitoren sowie Heparansulfat-Mimetika. Der Wirkmechanismus von letztgenannten basiert auf einer Unterbrechung der angiogenen Signalkaskade, da sie als synthetisch modifizierte Oligosaccharide die Konzentration von FGFs sowie VEGF verringern [30]. Damit wird die Ausbildung eines ternären Komplexes aus Wachstumsfaktor, Heparansulfat und Rezeptor unterbrochen. Heparanaseinhibitoren wirken der Freisetzung von Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren entgegen⁴. Auf die Möglichkeiten der Angiogenese mittels Gentherapie zu begegnen, wird in Abschnitt 1.15.3 näher eingegangen.

1.5 Biologie des kolorektalen Karzinoms (CRC)

Weltweit stellen die bösartigen Erkrankungen des kolorektalen Bereichs (CRC) bei Männern nach Bronchial- sowie Prostata-, bei Frauen nach Brust- bzw. Zervixkrebs die dritthäufigste Tumorerkrankung dar [33]. Jeder zweite betroffene Mann und zwei von drei erkrankten Frauen sind 70 Jahre

-
- 2) Einzig bisher für eine Anti-VEGF-Therapie zugelassen ist der Antikörper Bevacizumab, weitere Pharmaka werden z. Zt. nur *off-label* eingesetzt, z.B. Ranibizumab und RTKIs wie Sunitinib oder Sorafenib.
 - 3) Bei Aflibercept werden derzeit über 40 Studien durchgeführt. Ein weiterer Kandidat ist der RTK-Inhibitor BIBF1120, welcher gleichzeitig den VEGFR und den FGFR inhibiert.
 - 4) Beispielsweise PI-88, für welches bereits Phase-III-Studien existieren [31, 32].

und älter. Das Krankheitsbild CRC umfaßt Entartungen des Kolons, Rektums, Blinddarms sowie Anus (Klassifikation nach ICD-10: C18–C21). Dank der weit durchgeführten *Screening*-Methoden zur Früherkennung (z.B. Tests auf okkultes Blut im Stuhl, Koloskopie) sowie einer effektiven Behandlung durch chirurgische Entnahme mit anschließend kombinierter Chemo-/Strahlentherapie sind die 5-Jahres-Überlebensraten in Deutschland mittlerweile auf über 60% gestiegen⁵.

In ~90% aller Fälle von CRC handelt es sich um Adenokarzinome des Dickdarms. Der Hauptrisikofaktor, neben chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (z.B. Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn), zunehmendem Lebensalter, Bewegungsmangel sowie Übergewicht, langjährigem Rauchen, ballaststoffarmer sowie unausgewogener, fettreicher Ernährung mit hohem Alkoholkonsum, ist das Vorkommen von adenomatösen Darmpolypen, den sog. Adenomen [34]. Der pharmakologische Eingriff in das VEGF- sowie EGFR-*Signaling* stellt eine besondere Therapiestrategie bei CRC dar. Dazu stehen seit ~6 Jahren die monoklonalen Antikörper Bevacizumab sowie Cetuximab zur Verfügung [35-37].

Pionier in der Untersuchung der Pathogenese sowie molekularen Tumorforschung des CRC ist Bert Vogelstein [38, 39]. Eine genetische Vorbelastung erhöht das Risiko an CRC zu erkranken um den Faktor drei [40-42]. Auslöser der vererbaren Form von CRC, der sog. familiären adenomatösen Polyposis (FAP), ist eine Veränderung im sog. Wnt/ β -Catenin Signalweg, welche aus einer *loss-of-function*-Mutation im Tumorsuppressorgen *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) resultiert. In der Folge transloziert vermehrt β -Catenin in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl an Genen reguliert, welche das Tumorwachstum fördern (zur Übersicht [43]). Zhang *et al.* gelang es kürzlich durch eine Behandlung mit Retinsäure und TRAIL (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) in Zellen mit prämaligen Tumoren mit *APC*-Defekt eine Apoptose zu induzieren und damit das Polypenwachstum zu stoppen [44]. Dies weckt die Hoffnung, die momentan noch notwendige Vorbeugeoperation einer Kolektomie möglicherweise bald überflüssig zu machen. Neben *APC* sind bislang eine Vielzahl an mutierten Genprodukten beschrieben, welche in einem kausalen Zusammenhang mit der Etablierung eines soliden Karzinoms stehen, darunter u.a. Gene in der PI3K-Kaskade, k-ras, b-raf, EGFR, p53 sowie eine Deletion in Chromosom 18 (Verlust des Tumorsuppressors *DCC*, *deleted in colorectal carcinoma*) [45, 46]. Ray *et al.* ermittelten ferner, dass in frühen Stadien des Kolonkarzinoms während der Initiationsphase eine Hochregulation des Fibroblasten-Wachstumsfaktor bindenden Proteins (FGF-BP) erfolgt, insbesondere in dysplastischen Läsionen ([47, 48], Details siehe Abschnitt 1.12).

5) Der Anteil vollständiger Remissionen (*i.e.* symptomfreie Überlebenszeit nach ~5-10 Jahren) ist stadienabhängig [34].

1.6 Biologie des Zervixkarzinoms

In Deutschland bilden bösartige Erkrankungen des Gebärmutterhalses bei Frauen die dritthäufigste Tumorlokalisation, weltweit stehen sie sogar auf Platz 2 [33]. Auch wenn die relativen 5-Jahres Überlebensraten in der westlichen Welt mittlerweile auf über ~60% gestiegen sind, steht das Zervixkarzinom weltweit gesehen bei Frauen in der Statistik krebserkrankter Mortalitätsraten an erster Stelle der gynäkologischen Krebserkrankungen [33, 34]. 80% aller Zervixkarzinome haben ihren Ursprung im Plattenepithel, Adenokarzinome treten deutlich seltener auf und sind grundsätzlich mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden. Gebärmutterhalskrebs wird durch bestimmte Genotypen der humanen Papillomaviren (HPV), den sog. Hochrisiko(HR)-Typen verursacht (u.a. HR-HPV 16, 18, 31 und 45). In 90% aller Zervixkarzinome wird HPV-DNA nachgewiesen [49, 50]. Die in dieser Arbeit untersuchte Modellzelllinie ME-180 ist ebenfalls HPV-positiv [51, 52]. 2008 wurde Harald zur Hausen für die Entdeckung des Zusammenhangs eines Befalls mit onkogenen Viren und dem Auftreten von Krebserkrankungen im Uterus der Nobelpreis für Medizin verliehen [53]. Impfungen gegen Gebärmutterhalskrebs sind seit 2006 erhältlich. Die bisher durchgeführten klinischen Studien zeigen eine Wirksamkeit von 96% gegen persistierende Infektionen bei einer nahezu 100%igen Sero-konversion (zur Übersicht [54, 55]). Aufgrund der hervorragenden Sicherheitsdaten wird daher in Deutschland seit 2007 von der STIKO eine generelle Impfung für Mädchen im gebärfähigen Alter (12-17 Jahren) empfohlen [56]. Dazu stehen seit 2006 zwei Impfstoffe zur Verfügung (Gardasil® von Sanofi-Aventis und Cervarix® von GSK). Beide sind zur vorbeugenden Immunisierung gegen einige der Gebärmutterhalskrebs auslösenden HPV zugelassen. Eine Übersicht über Therapiempfehlungen sowie neue Strategien bei der Behandlung des Zervixkarzinoms findet sich bei Movva *et al.* [57].

1.7 Tumormarker und Quantifizierung der Genexpression

Erst das tiefere Verständnis über die molekularen Ursachen der Krebsentstehung ermöglichte neue Behandlungsstrategien bei Tumorerkrankungen. Ziel der sog. molekularen Onkologie ist es, durch eine präzise Diagnostik der genetischen Läsionen „paßgenaue“ therapeutische Maßnahmen zu ergreifen. In diesem Zusammenhang spielt die Erfassung der Tumormarker eine wichtige Rolle, da deren (Plasma-)Konzentration und neoplastisches Wachstum häufig in einer direkten Korrelation zueinander stehen. Exemplarisch sei hier der FSH-Rezeptor genannt. 2010 erweiterte die Arbeitsgruppe um Radu die Liste der prognostischen Indikatorproteine um den genannten G-Protein gekoppelten Rezeptor, da die Expression in allen Tumorgewebeproben von >1300 Patienten mit elf verschiedenen Krebsarten konstant positiv war [58]. Damit kommt dem hormonsensitiven Rezeptor, welcher in Normalgewebe üblicherweise nur in Ovarien, Hoden sowie dem Uterus gefunden wird, eindeutig die Rolle eines tumorrelevanten Biomarkers zu.

Ein zu untersuchendes Gen sollte möglichst auf der Ebene des *endgültigen* Expressionsproduktes quantifiziert werden. Dieses wird bei den meisten Genen durch ein Protein repräsentiert. Western blotting, Immunhistochemie, FACS oder ELISA sind zwar robuste sowie gut standardisierbare Verfahren, um die Genaktivität auf der (post-)translationalen Stufe zu quantifizieren, jedoch muss berücksichtigt werden, dass eine gegebene Proteinkonzentration nicht zwangsläufig auch eine entsprechende Zahl an Transkripten widerspiegelt. Die Kontrolle über die tatsächlich vorliegende Proteinmenge erfolgt, neben den Regulationsmechanismen auf transkriptioneller Ebene, ebenso durch das Zusammenspiel einer Reihe von Einflußfaktoren, wie der Halbwertszeit sowie der Aktivität von proteinstabilisierenden Interaktionspartnern (näheres dazu siehe Abschnitt 5.2). So können erhöhte Proteinspiegel auch unabhängig von Genamplifikationen auftreten. In einigen Fällen ist sogar eine inverse Korrelation zwischen mRNA- und Proteinlevel beschrieben, beispielsweise wenn das Polypeptid einem starken proteasomalen Abbau unterliegt (Degradation nach Ubiquitylierung [59, 60]). Insbesondere bei sekretierten Proteinen besteht die Schwierigkeit, diese auf translationaler Ebene zu quantifizieren, da sie dem zellulären Gleichgewicht nach Sekretion schnell entzogen werden. Methoden zum Nachweis der Expression auf mRNA-Ebene, zumeist PCR-basierte Verfahren (z.B. *qRT-PCR*), eignen sich gut, um Transkripte zu quantifizieren (beispielsweise in Form von „Kopienzahl pro Zelle“ oder in Relation zum Gesamtgenom). Northern blotting ermöglicht es, verschiedene Splicevarianten voneinander zu unterscheiden; Microarrays weisen den Vorteil der parallelen Detektionsmöglichkeit für eine Vielzahl an Genprodukten auf; moderne, *tag*-basierte Methoden wie die SAGE (serielle Analyse der Genexpression) erlauben sogar die Erfassung des gesamten Transkriptoms [61, 62]; durch die Weiterentwicklung der ISH (*in situ*-Hybridisierung), die sog. FISH (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung), können Chromosomenaberrationen wie Translokationen (*Rearrangements*) aufgefunden werden; die Immunhistochemie (IHC) gibt das Expressionsprofil eines *target*-Gens in einem Gewebeschnitt wieder. Darüber hinaus sind im Einzelfall zusätzlich differentielle Analysen nach bestimmten Polymorphismen notwendig, z.B. SNP(Einzelnukleotid-Polymorphismen)-Genotypisierung zum Auffinden von Punktmutationen oder Deletionen, was beispielsweise mit dem Tumorsuppressor p53 routinemäßig durchgeführt wird [63]. Unabhängig von allen Diagnosemöglichkeiten muss betont werden, welche wichtige Rolle konsequente Früherkennungsuntersuchungen einnehmen. Dies gilt insbesondere bei familiärer Häufung von vererbaren Tumorleiden⁶, da die Karzinogenese ein mehrstufiger Prozeß ist und Krebs als maligne Erkrankung häufig erst nach mehreren Jahren klinisch relevant wird (näheres dazu siehe Abschnitt 1.1).

6) Beispielsweise die familiäre adenomatöse Polyposis (syn. Familiäre Polyposis Coli, FAP), das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) oder Defekte im DNA-Reparatursystem. Letztgenannte sind Folge von Mutationen bzw. Deletionen in den *BRCA1/2*-Genen und treten insbesondere im Mammakarzinom häufig auf.

1.8 Krebstherapie und Antitumormittel

Bei der medikamentösen Behandlung von Krebserkrankungen ist die eigentliche Chemotherapie mit Zytostatika von Substanzen abzugrenzen, welche *nicht* unmittelbar auf die Zellteilung wirken. In Abhängigkeit vom Wirkmechanismus wird dabei zwischen Pharmaka unterschieden, welche entweder in die Signaltransduktion eingreifen (z.B. RTKIs), die Ausbildung eines Tumorgefäßsystems unterbinden (Angiogenesehemmer) oder in die körpereigene Immunabwehr involviert sind, indem sie Tumorantigene erkennen und so natürliche Abwehrmechanismen modulieren (z.B. Trastuzumab bei HER2/neu-Überexpression). Bei hormonabhängigen Tumoren wird darüber hinaus ein Hormonentzug mit Antihormonen durchgeführt. Die meisten Zytostatika weisen einen p53-abhängigen Wirkmechanismus auf (zur Übersicht [64]). Eine Pharmakotherapie bei Krebs ist zu individualisieren nach Art und Ausdehnung des Tumors, Dauer der Erkrankung sowie Konstitution und Alter des Patienten. Desweiteren sind bestehende Begleiterkrankungen und psychische Stabilität des Erkrankten mit einzubeziehen. Um das Auftreten von UAWs zu reduzieren und eine Verbesserung der Lebensqualität zu gewährleisten, bildet die sog. Supportivtherapie einen integralen Bestandteil der antitumoralen Behandlung (beispielsweise durch die Gabe von Glucocorticoiden oder 5-HT₃-Antagonisten bei Hyperemesis). Zytostatika weisen eine *limitierte Selektivität* auf, da sie unspezifisch stark proliferierendes Gewebe als primäre Zielstrukturen angreifen (z.B. Krebszellen, Keimdrüsen, Haarfollikel, Schleimhäute). So werden essentielle zelluläre Abläufe im Tumor, aber auch in anderen Teilen des Körpers unterbrochen bzw. nachhaltig gestört. Nicht selten erzwingt dies eine mehrwöchige Unterbrechung bzw. stellt sogar einen Grund für den Abbruch einer Chemotherapie dar. Die Wahl einer Medikation richtet sich nach der therapeutischen Absicht; entweder kurativ, mit Verlängerung der Überlebenszeit, oder palliativ. Zumeist beinhaltet das anzuwendende Regime eine kombinierte, diskontinuierliche Stoßtherapie, bei der die Behandlung nach einem festen Schema vorgegeben wird (beispielsweise FOLFOX bei CRC, bestehend aus Folinsäure (FS), 5-Fluoruracil und Oxaliplatin). Es schließt neben Zykluslänge und zeitlicher Abfolge der Applikationen einzelner Kombinationspartner ebenso die behandlungsfreie Zeit mit ein. Die Wirkung von Zytostatika unterliegt i.d.R. einer Kinetik nullter Ordnung. Dadurch wird jeweils ein konstanter Prozentsatz, nicht eine konstante Zahl an Tumorzellen zerstört. Da die Verdoppelungszeit der Zellen auch unter Therapie konstant bleibt, hängt die Effektivität einer Behandlung von der vorliegenden Anzahl an entarteten Zellen im Körper ab. Aus diesem Grund sollte der Primärtumor möglichst vollständig entnommen werden, damit eine anschließende Behandlung gezielt etwaige Metastasen erreicht. Eine gefährliche Nebenwirkung der Zytostatikabehandlung beruht auf dem mutagenen Potential der Arzneimittel. Insbesondere Alkylantien und Topoisomerase-II-Hemmer können nach längerer Anwendungsdauer selbst kanzerogen wirken [65, 66]. Ein weiteres Problem der Zytostatika stellt ihre schlechte Resorptionsquote dar. Es existieren kaum peroral verfügbare Arzneimittel, so dass der Großteil aller Wirkstoffe parenteral appliziert werden muss, was eine zusätzliche Belastung für den Patienten bedeutet (zur Übersicht [67]).

1.9 Resistenzen gegenüber Chemotherapie

Resistenzen gegenüber Antitumorstoffen stellen ein großes Problem in der Therapie von Krebserkrankungen dar. Die Pharmakogenetik befasst sich mit den (epi-)genetischen Mechanismen in der Entwicklung von Resistenzen. Häufig sind die Ursachen multifaktoriell und basieren auf einer Kombination mehrerer, teils voneinander unabhängiger Mechanismen. Dabei zu nennen sind zelluläre Aufnahmedefekte, ein verstärkter Effluxtransport sowie eine gesteigerte Metabolisierung der Xenobiotika. Zellinterne Faktoren wie entgleiste Apoptose-Regulation, deregulierte MAPK-Signalwege oder erhöhte Toleranz gegenüber DNA-Schäden spielen jedoch ebenso eine große Rolle (zur Übersicht [68, 69]). Man unterscheidet primäre von erworbenen, sekundären Resistenzen. Letztgenannte basieren auf der Überexpression von sog. *mdr* (*multiple drug resistance*)-Genen wie ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter oder P-gp (P-Glykoprotein, syn. MDR1 resp. ABCB1). Insbesondere bei der Therapie mit Spindelgiften erschwert P-gp den Erfolg einer Behandlung (zur Übersicht [70]). Werden *mdr*-Gene in resistenten Zelllinien beispielsweise durch siRNAs supprimiert, so reagieren Tumorzellen wieder empfindlicher auf Chemotherapeutika ([71], zur Übersicht [72]).

1.10 Tumormodelle und Zellmatrixkomponenten

Im lebenden Organismus sind Tumorzellen einer grundlegend anderen (Mikro-)umgebung ausgesetzt als im isolierten System einer Reinzellkultur, in welchem zelluläre Prozesse autonom reguliert werden und keinen pleiotropen Einflüssen unterliegen (mit Ausnahme externer Stimuli, wie beispielsweise der Zusatz von Serum). Der Tumorzellverband ist in ein funktionierendes Gefäßsystem eingebunden, welches den Austausch von Stoffwechselprodukten sowie eine Kommunikation unterschiedlicher Gewebekomponenten miteinander ermöglicht. Damit steht das Tumorgewebe in komplexer wechselseitiger Beziehung zu vielen weiteren Zellen epithelialen sowie nicht-epithelialen Ursprungs (z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, infiltrierende Immunzellen), welche eine zusätzliche Kontrolle auf das Wachstum ausüben. Der Übergang vom physiologischen Gewebeverband zum isolierten *in vitro*-Wachstum induziert dabei nicht nur in morphologischer Hinsicht Adaptationsprozesse. Ebenfalls abhängig von der Art der zellulären Verflechtung werden Informationssignale der Zellen verarbeitet (zur Übersicht [73, 74]). Dies ist u.a. auf die kultivierungsabhängige Ausbildung der Zellmatrix zurückzuführen. So zeigen Tumorzellen im *Monolayer*, in welchem die Zellen lediglich über ein flächiges Netzwerk miteinander in Kontakt stehen, ein anderes Wachstumsverhalten als unter dreidimensionalen Bedingungen im räumlichen Zellverband (sog. 2D→3D-Transition, [75]). Weigelt *et al.* ermittelten beispielsweise, dass das *HER2-Signaling* in Brustkrebszellen stark von der 3D-Architektur der Zellmatrix abhängt, was unmittelbar veränderte Sensitivitäten gegenüber den *HER2-targeting*-Wirkstoffen Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib zur Folge hat [76]. Bei der Durchführung von

in vitro-Experimenten sind daher jene Parameter zu berücksichtigen, welche sich aus der Art der Kultivierung ergeben (z.B. Zelldichte, Wachstum in Suspension oder Adhärenz, Einzell- oder Ko-Kultur). Folglich erlauben Zellkulturmethoden es lediglich, bestimmte Fragestellungen unter vereinfachten Bedingungen zu untersuchen und bedürfen einer Bestätigung durch weitere Modelle (zur Übersicht [14, 77, 78]). Während bei den sog. syngenischen Modellen die zu untersuchenden Zellen einer einheitlichen Species entstammen, kommen „Empfänger“ und „Spender“ in xenogenen Systemen aus unterschiedlichen Organismen. Im syngenischen Modell sind humanspezifische Fragestellungen häufig nur schwer durchführbar. Daher ist das Xenograft-Modell mit immundefizienten Tieren das bevorzugte System, um eine *in vivo*-Situation möglichst naturgetreu nachzuempfinden (zur Übersicht [79]).

Es ist erwiesen, dass zwischen Tumorgeschehen und veränderten Vorgängen in der Extrazellulären Matrix (EZM) ein direkter Zusammenhang besteht [80-82]. Die EZM ist über ihre Bedeutung als innerer Strukturgeber⁷ hinaus auch für die funktionelle Steuerung der Zelle verantwortlich. Sie bildet für externe Wachstumsfaktoren ebenso ein Reservoir wie für endogen produzierte und anschließend sekretierte Mitogene. Damit stellt sie den direkten Teil des Interzellularraums dar, an welchem Signaltransduktionsprozesse (Weiterleitung extrazellulärer Signale ins Zellinnere) initiiert werden. Bei der Differenzierung, dem Wachstum, der Migration und der Expression gewebespezifischer Gene einer Zelle ist die EZM ebenso mitbeteiligt wie die Wachstumsfaktoren selbst (zur Übersicht [83-85]). Zusammen mit den Zellmatrix-assoziierten Proteinen spielt sie eine entscheidende Rolle bei der Spezifität des jeweiligen Gewebes⁸. Dieser beträchtliche Einfluß der EZM auf die Funktion und das Überleben einer Zelle wurde ursprünglich von Bissell unter dem Begriff „*dynamic reciprocity*“ geprägt [87, 88]. Proteoglykane, zumeist Glykosaminoglykane (GAGs), repräsentieren einen zentralen Bestandteil der EZM⁹. Hochrechnungen Gabyus' zufolge sind ca. 1% der kodierenden Sequenzen im Genom verantwortlich für die Biosynthese der Proteoglykane (zur Übersicht [90-93]). Als Glykoproteine bestehen sie aus einer zentralen Eiweißkomponente (*core*-Protein) sowie modifizierten Zuckern, welche kovalent an das *core* gekoppelt werden. Eine wichtige Klasse von Enzymen, die diese Verknüpfung katalysieren, sind die N-Acetyl-Glucosaminyl-Transferasen (GlcNAc-Ts, kurz: GnTs). Diese Enzyme, welche unter anderem auch in humanem Serum gefunden werden [94], koppeln UDP-Zucker N-glykosidisch an Proteine¹⁰ und sind damit entscheidend für posttranslationale Modifikationen von Glykoproteinen verantwortlich¹¹ (zur Übersicht [97, 98]). Innerhalb der GnTs werden die Klassen I-VI unterschieden, wobei insbesondere GnT III und GnT V als tumorrelevant gelten (zur Übersicht [99]). Während für die Aktivität der GnT V ein eher pro-tumorigener Effekt beschrieben ist (verstärkte

7) Zusammen mit dem Zytoskelett ist die EZM verantwortlich für den Aufbau der mechanischen Stabilität einer Zelle.

8) Beeindruckende Bilder von Umbauprozessen der EZM während der Zellteilung finden sich bei Kubow *et al.* [86].

9) Eine Übersicht über die Rolle von GAGs bei Krebs findet sich unter [89].

10) Potentiell können 70% aller Proteine N-glykosidisch modifiziert werden (zur Übersicht [95, 96]).

11) Somit auch für Wachstumsfaktoren und FGF-BP.

Zellmotilität, Verlust der Kontaktinhibition, HER2-abhängige Hochregulation [100, 101]), steht die Aktivität der GnT III eher in Zusammenhang mit einer antitumorigenen Wirkung [102]. Die Einteilung der Proteoglykane erfolgt in Abhängigkeit von der Hauptkomponente der Glykosaminoglykankette. Dabei werden die vier Hauptgruppen Dermatan-, Chondroitin-, Keratan- sowie Heparansulfat-Proteoglykane voneinander unterschieden. In ihrer Gesamtheit faßt man diese zu den sog. Heparin-ähnlichen Proteoglykanen (HLGAGs, *Heparin-like Glycosaminoglycans*) zusammen.

1.11 Wachstumsfaktoren und FGFs

Der Begriff Wachstumsfaktor stellt eine Sammelbezeichnung für eine Vielzahl an Proteinen aus unterschiedlichen Gruppen dar, welche bei der Proliferation und Differenzierung eine zentrale Rolle spielen. Sie fungieren als Mediatoren in der zellulären Informationsweiterleitung, indem sie ihren Wirkort, zumeist membranständige Rezeptoren, zielgerichtet besetzen und so Signale in den Interzellularraum übertragen. Ein Großteil aller Wachstumsfaktoren wird sezerniert und anschließend in der EZM gespeichert. Hierfür weisen sie spezifische Interaktionsdomänen auf, welche die Bindung an Zellmatrixbestandteile vermitteln. Neben prominenten Vertretern wie VEGF, EGF und PDGF bilden die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs) die größte Familie innerhalb der Wachstumsfaktoren. Die hohe Affinität zu Heparin-ähnlichen Proteoglykanen (HLGAGs) ist eine charakteristische Gemeinsamkeit vieler Wachstumsfaktoren. Die HLGAGs erhöhen die Affinität der Wachstumsfaktoren zum jeweiligen Rezeptor. Zudem schützen sie die Proteine vor einer enzymatischen Zersetzung (Proteolyse).

1.11.1 Struktur und Wirkmechanismus der FGFs

Die Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren umfasst eine Gruppe von derzeit 23 bekannten Vertretern. Im Menschen werden 22 FGFs nachgewiesen, von denen 18 (FGF1–FGF10 sowie FGF16–FGF23) als endogene Liganden des FGF-Rezeptors (FGFR) fungieren [103]. FGF11–FGF14 weisen zwar hohe Sequenzidentitäten zu den übrigen Mitgliedern auf, jedoch fehlt ihnen die Affinität zum FGFR [103]. Man stuft sie daher nicht als „klassische“ FGFs ein, sondern bezeichnet sie als *fibroblast growth factor homologous factors*, FHF1–FHF4 [104] bzw. *i*FGFs, da sie hauptsächlich in intrazelluläre Prozesse involviert sind (zur Übersicht [105]). Die historische Bezeichnung Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) läßt sich auf die ursprüngliche Entdeckung zurückführen, dass die zuerst gefundenen Vertreter, FGF1 (syn. *a*FGF, *acid*) und FGF2 (syn. *b*FGF, *basic*), speziell die Proliferation von Fibroblasten fördern [106]. Das mitogene Spektrum der FGFs geht jedoch weit über einen Fibroblasten-stimulierenden Effekt hinaus. Maßgeblich für die Klassifizierung der FGFs ist daher die Struktur der Signalmoleküle, nicht deren biologische Wirkung. FGF7 (syn. KGF, *keratinocyte growth factor*) übt beispielsweise ausschließlich auf epitheliale Zellen einen biologischen Effekt aus, nicht aber auf endotheliale Zellen oder Fibroblasten [107].

Humane FGFs bestehen aus ~150-300 Aminosäuren, was einer Masse von ~17-34 kDa entspricht. Die phylogenetische Einteilung der FGFs in die 6 Subfamilien erfolgt nach strukturellen Gemeinsamkeiten in die FGF1-Gruppe (FGF1/2), die FGF7-Gruppe (FGF3/7/10/22), die FGF4-Gruppe (FGF4/5/6), die FGF8-Gruppe (FGF8/17/18), die FGF9-Gruppe (FGF9/16/20) sowie die FGF19-Gruppe (FGF15 resp. 19¹²/21/23). Während die erstgenannten Vertreter klassischerweise als parakrine Faktoren agieren, dominiert in der FGF19-Gruppe eine endokrine Funktionsweise (sog. *hFGFs*, *hormone-like FGFs*)¹³. Bei physiologischen Vorgängen spielen FGFs eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung, Differenzierung, Organogenese sowie Wundheilung. Desweiteren sind sie an der Regulation von Proliferation und Migration beteiligt und spielen daher bei der Tumorigenese eine zentrale Rolle (zur Übersicht [110]). Gemeinsames Strukturmerkmal aller FGFs ist die konservierte Kerndomäne („*central core*“) mit einer Sequenzidentität zentraler Aminosäuren von ~30-60%. Alle FGFs weisen eine hohe Affinität zu den polykationischen heparinähnlichen Glykosaminoglykanen (HLGAGs) in der EZM auf. Die nichtkovalente Interaktion zwischen Wachstumsfaktoren und Heparin-Makromolekülen wirkt proteinstabilisierend und schützt vor proteolytischer Degradation ([111], zur Übersicht [112]). Ferner sind die HLGAGs zwingend notwendig für die FGF-Signaltransduktion, da nur in deren Anwesenheit eine Bindung der FGFs an den FGFR erfolgen kann (Dabei kommt es zur Ausbildung eines ternären Komplexes, bestehend aus FGF, FGFR und Heparin [113], zur Übersicht [18, 114]).

FGFs fungieren als endogene Liganden des membranständigen FGF-Rezeptors (FGFR). Dieser gehört zur Klasse der Rezeptor Tyrosinkinasen (RTK). In Säugern existieren vier unterschiedliche *FGFR*-Gene (*FGFR1* - 4) mit mehreren, durch alternatives *Splicen* gebildeten Isoformen¹⁴. Der FGFR besteht aus drei extrazellulären Ig(Immunglobulin)-Domänen (D1 - D3), einer transmembranären Helix und einer intrazellulären TK(Tyrosinkinase)-domäne. Das FGF-*Signaling* unterliegt einer hochkonservierten Transduktionskaskade mit einer durch die Ligandenbindung induzierten Dimerisierung des Rezeptors und dadurch ausgelösten Tyrosinkinase-Aktivierung. Die intrazellulär transphosphorylierten Tyrosinreste fungieren als Adaptoren für weitere Faktoren wie beispielsweise die SH2-(*Src homology 2*)-Domäne der PLC γ (Phospholipase C γ) oder FRS2 (*FGFR substrate 2*). Die Hauptsignalwege im FGF/FGFR-*Signaling* sind die Aktivierung von (i) RAS–RAF–MAPK, (ii) PI3K–AKT, (iii) STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) und (iv) PKC. Kontextabhängig kann aber auch eine Induktion der MAP-Kinasen p38 und JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*, syn. SAPK, *Stress-activated Phospho Kinase*) sowie RSK2 (*Ribosomal Protein S6 Kinase*) erfolgen (zur Übersicht [110]).

12) *FGF15* wird als murines Orthologes zu humanem *FGF19* angesehen.

13) Die Mitglieder der FGF19-Gruppe entfalten eine überwiegend systemische Wirkung im Organismus (insbesondere FGF23). Sie fungieren als Regulatoren im Energiestoffwechsel und sind an der Aufrechterhaltung des Vitamin D- und Phosphat-haushalts beteiligt [108]. Dabei ist zusätzlich die Anwesenheit des Klotho-Kofaktors notwendig [109].

14) Ein fünfter FGF-Rezeptor wurde ebenfalls beschrieben (FGFRL1). Diesem fehlt allerdings die zytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne, so dass er nicht Teil des klassischen FGF-*Signalings* ist [115].

Durch mehrere Mechanismen tragen FGFs zum zellulären Überleben bei und damit zur Proliferation malignen Gewebes. Zum einen wirken sie als direkte Mitogene auf eine Vielzahl von Zellen, ferner sind sie potente Angiogenesefaktoren (siehe Abschnitt 1.3). Indirekt greifen sie über anti-apoptotische Signalbahnen in die Inhibition des programmierten Zelltods ein. Dies passiert u.a. durch eine Aktivierung der PI3K–AKT-Achse sowie durch die Induktion von Bcl-2 und Bcl-x_L [116]. FGF2 wirkt darüber hinaus anti-apoptotisch, indem es den RSK-(ribosomalen S6-Kinase, S6K2)-Weg induziert und damit die Konzentration von XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis-protein*) sowie weiteren IAPs (*Inhibitor of Apoptosis-protein*) erhöht [117]. Da bislang keine aktivierenden Mutationen von FGFs bekannt sind, ist deren biologische Aktivität bei neoplastischem Wachstum entweder auf eine Überexpression oder eine erhöhte Verfügbarkeit durch verstärkte Bioaktivierungs- und Freisetzungsmechanismen zurückzuführen (zur Übersicht [110, 118]). Um pharmakotherapeutisch in das FGF-Signaling einzugreifen, werden Sunitinib und Suramin eingesetzt. Der Wirkmechanismus dieser niedermolekularen Pharmaka basiert (u.a.) auf einer Inhibition der FGFs am FGFR (RTK-Inhibitoren). FGFs sind maßgeblich an der Gefäßneubildung beteiligt. Durch Einsatz der Angiogenese-hemmer wird daher die FGF/FGFR-Signaltransduktion im Tumors stark beeinträchtigt. Dazu stehen die Wirkstoffe Thalidomid und Lenalidomid zur Verfügung, deren Anwendung jedoch einer äußerst strengen Indikationsstellung unterliegt¹⁵. Ferner stehen neben der Erforschung der FGFR-Antagonisten derzeit die sog. Heparin-Mimetika im Fokus klinischer Forschung (noch nicht zugelassen, Details siehe Abschnitt 1.3).

1.11.2 Lokalisation und Freisetzung von FGFs

Die meisten FGFs (FGF3-8, 10, 17-19, 21, 23) verfügen über ein N-terminales Sekretionssignal. Sie werden über den klassischen Signalweg des endoplasmatischen Retikulums-(ER)/Golgi-Intermediärkompartiment ERGIC (*endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*) aus der Zelle befördert. Eine Ausnahme bilden FGF1, -2, -9, -16 und -20, da sie kein Signalpeptid aufweisen. Dennoch befinden auch sie sich in hoher Konzentration außerhalb der Zelle, was die Existenz von alternativen Sekretionsmechanismen nahelegt ([120, 121], zur Übersicht [122]). FGF1 und -2 besitzen (neben weiteren FGFs) ein Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localization signal*). FGFs sowie FGF/FGFR-Komplexe werden daher auch im Zellkern vorgefunden (zur Übersicht [123]). Der größte Teil aller FGFs wird jedoch in der EZM gespeichert. Bei einer mechanischen Gewebeerstörung erfolgt eine vermehrte Freisetzung von FGFs, so dass im Zuge des Heilungsprozesses transient

15) Der genaue Wirkmechanismus von Thalidomid wurde erst unlängst von Ito *et al.* aufgeklärt [119].

erhöhte Wachstumsfaktorkonzentrationen im Bereich der Wunde auftreten. Jedoch unterliegt dieser Steuerungsmechanismus keiner regulierbaren Kontrolle. Die Spaltung der HSPGs durch Glykosaminoglykan-abbauende Enzyme (z.B. Heparanasen) stellt einen enzymatischen Weg der FGF-Freisetzung dar. Durch die Aktivitäten dieser Enzyme werden neben den FGFs jedoch auch eine Vielzahl weiterer Heparin-bindender Wachstumsfaktoren aus der EZM herausgelöst ([124], zur Übersicht [125, 126]). Mutagenesestudien ergaben, dass die Freisetzung der FGFs in der Karzinogenese ein limitierender Schritt ist. Die vermehrte Freisetzung von FGF2 infolge einer Genfusion von FGF2 mit einem Signalpeptid führt beispielsweise zur Transformation nicht-tumoriger Zellen [127]. Ein Mechanismus der spezifischen FGF-Bioaktivierung beruht auf der Aktivität des biologischen *Carrier*-Proteins FGF-BP. Dieses steht im Fokus der vorliegenden Arbeit und wird nachstehend genauer charakterisiert.

1.12 FGF-BP

1.12.1 Strukturelle Charakterisierung

FGF-BP (*i.e.* FGF-BP1) wurde erstmals 1991 von Wu *et al.* in A431-Zellen als HBp-17 (Heparin-Bindeprotein 17 kDa) beschrieben [128]. Die von der 1163 nt. langen cDNA abgeleitete Primärstruktur ist in Abb. 1 gezeigt. Das humane *full length* Protein besteht aus 234 Aminosäuren und beinhaltet ein 33 Aminosäuren langes Signalpeptid, welches nach der zellulären Sekretion abgespalten wird. Met¹⁶⁸ stellt eine weitere Spaltstelle dar, so dass eine verkürzte Variante von extrazellulärem FGF-BP in der SDS-PAGE eine apparente Laufhöhe von ~17 kDa aufweist. Darüber hinaus werden auch höhermolekulare Formen aufgefunden (Immunreaktion bei ~23, ~26, ~34 kDa) [129, 130]. Die Bildung stabiler Di- resp. Oligomere von FGF-BP wurde bereits zuvor von Aigner *et al.* sowie Sauter *et al.* gezeigt [129, 131]. Das humane Protein ist zweifach glykosyliert (Asn⁹⁹/ Ser¹⁷²) und hat aufgrund des erhöhten Anteils an basischen Aminosäuren ($\Sigma_{\text{Lys/Arg}} \sim 17\%$) einen isoelektrischen Punkt (pI) von ~9,3. Zwischen Arg¹¹⁰ und Phe¹⁴³ befindet sich ein *Cluster* basischer Aminosäuren, der für die Bindung an Heparin relevant ist [132]. Weitere mögliche Heparin-Interaktionsdomänen befinden sich zwischen Lys²⁵ und His³² sowie Lys¹⁶³ und Ser¹⁶⁹ (Abschnitt Lys²⁵-His³² liegt innerhalb des Signalpeptids und geht im Verlaufe des sekretorischen *traffickings* verloren). Die Positionen aller fünf Disulfidbrücken (Cys⁷¹-Cys⁸⁸, Cys⁹⁷-Cys¹³⁰, Cys¹⁰⁶-Cys¹⁴², Cys¹⁹⁸-Cys²³⁴, Cys²¹⁴-Cys²²²) im Protein sind innerhalb der Spezies Maus, Ratte und Mensch konserviert [133]. Eine *blastn*-Suche in der Nukleotidsequenzdatenbank des NCBI nach *FGF-BP1* (RefSeq mRNA NM_005130.3) liefert mit Ausnahme der Gene *FGF-BP2* und *FGF-BP3* (s.u.) keine relevanten Treffer. Auch eine Suche anhand der Primärstruktur von FGF-BP in der Proteindatenbank des SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) zeigt, dass keine Homologien zu den dort hinterlegten Proteinen bestehen.

1.12.2 Die FGF-BP-Proteinfamilie

Das Transkript von *FGF-BP2* (RefSeq mRNA NM_031950.3) wurde erstmals 2001 von Ogawa *et al.* als Ksp37 (*Killer-specific secretory protein 37 kDa*) beschrieben [134]. *FGF-BP2* befindet sich nahe des Genlocus für *FGF-BP1* (*FGF-BP1* auf 4q15.3, *FGF-BP2* auf 4p16). Die Homologie von FGF-BP2 zu FGF-BP beträgt ~40% bei einer Sequenzidentität von ~20% [135]. 2008 wurde von Zhan *et al.* ein drittes Protein der Familie entdeckt (*FGF-BP3*, RefSeq mRNA NM_152429.4) [136]. Dieses liegt auf Chromosom 10 (10q23.32). Die Arbeitsgruppe von Anton Wellstein führte eine Sequenzalignierung für alle drei humanen *FGF-BP*-Gene (*hFGF-BP1-3*) durch [136]. Ein Alignment von *FGF-BP1* für die Spezies Maus, Ratte und Mensch wurde von Aigner *et al.* publiziert [137]. Die Homologie der *FGF-BP1*-Gene von Ratte und Mensch beträgt beispielsweise 70%. Dem humanen FGF-BP homologe sowie funktionell ähnliche Proteine wurden außerdem in Hühnern [138] sowie im Zebrafisch [139] ermittelt (Sequenzhomologien >50%).

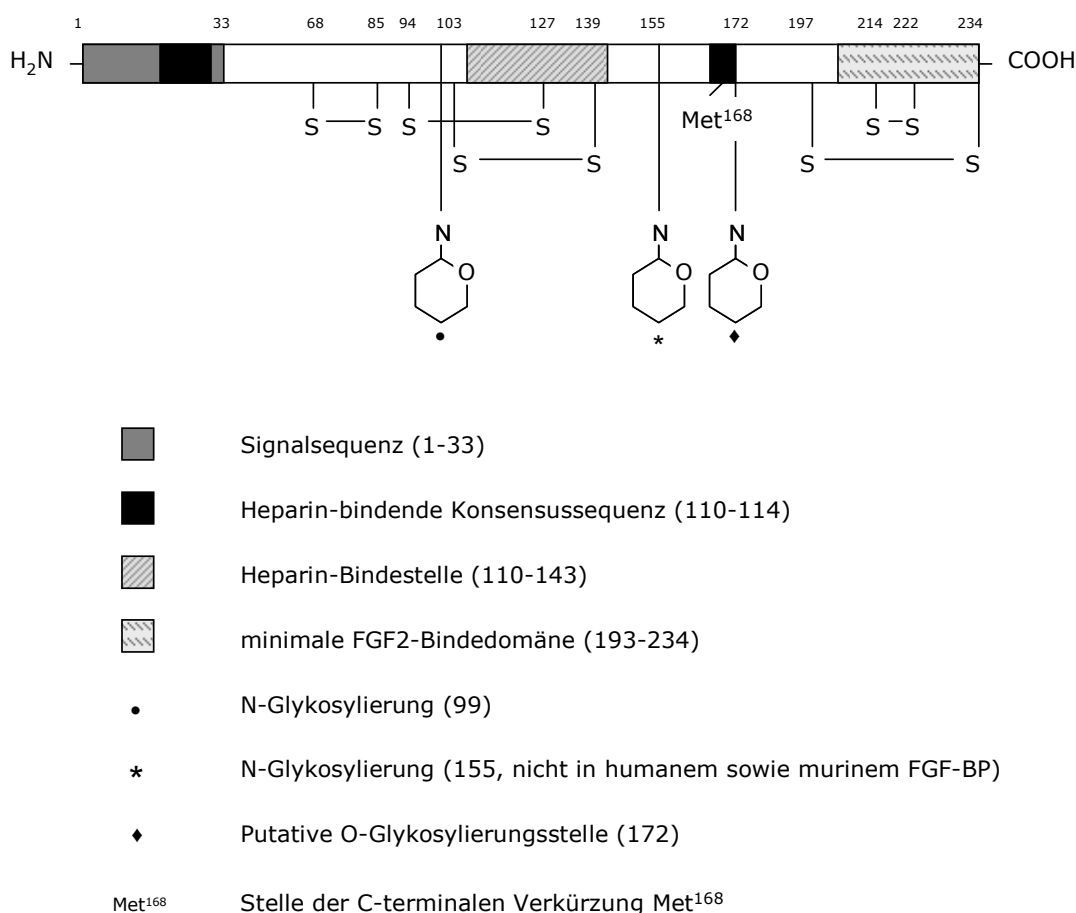


Abb. 1: Primärstruktur von FGF-BP mit relevanten Interaktionsdomänen (modifiziert nach Abuharheid [140]). Alle 5 Disulfidbrücken (–S–S–) innerhalb der Species Maus, Ratte, Mensch sind konserviert. Die Signalsequenz für die Proteinsekretion, die Heparin- sowie FGF2-Bindedomäne(n) und Glykosylierungsstellen sind in Klammern mit den jeweiligen Aminosäuren angegeben.

1.12.3 FGF-BP-Expression in Normalgewebe und Neoplasien

Das Expressionsmuster von FGF-BP weist eine hohe Gewebespezifität auf, was in der biologischen Funktion des Proteins begründet ist. Während der (murinen) Embryonalentwicklung erfolgt eine transiente transkriptionelle Aktivierung von *FGF-BP*, insbesondere in Haut, Darm und Thymus [141, 142]. Postnatal wird *FGF-BP* rasch herunterreguliert, so dass im adulten Normalgewebe die Expression normalerweise unterhalb der Detektionsschwelle des Northern blots liegt [141, 143].

In einer Reihe von Studien konnte ein Zusammenhang zwischen FGF-BP-Überexpression und tumorigenen Entartungen (insbesondere mit Ursprung im Plattenepithel) festgestellt werden. Hierzu zählen Tumore der Haut [142-144], des Kopf-/Hals-Bereichs [145, 146], der Zervix [147], der Prostata [148], der Brust [149, 150] und des Pankreas [47, 48, 130, 151]¹⁶. Neben den genannten Lokalisationen finden sich besonders hohe FGF-BP-Expressionslevel in Tumoren des kolorektalen Bereichs (CRC) [47, 48, 130, 147, 151]. Ray *et al.* ermittelten in humanen gastrointestinalen Gewebeproben die Hochregulation von *FGF-BP* in ~70% aller Biopsien mit Dysplasien [47]. In Normalgewebe sowie in Gewebe aus Patienten mit chronischen Darmentzündungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) ist FGF-BP hingegen nicht erhöht (nur in ~15% aller Fälle per IHC nachweisbar). Bei Untersuchungen in sog. *APC^{Min/+}*-Mäusen, welche einen Defekt im Tumorsuppressorgen *APC* aufweisen¹⁷, konnte gezeigt werden, dass sich das Expressionsprofil von FGF-BP mit dem von β -Catenin deckt [47]. Beide Gene sind in dysplastischen Läsionen hochreguliert. Promotorstudien ergaben, dass *FGF-BP* ein *target*-Gen des aktivierten Wnt/ β -Catenin-Pathways ist [47]. Der Anstieg von FGF-BP in präkanzerösem Gewebe repräsentiert damit ein frühes Ereignis in der Initiation von CRC (zur Übersicht [48, 151]). Da FGF-BP unter prämaligen Konditionen früh verstärkt gebildet wird (sog. „*immediate-early*“-Gen) [155], könnte dessen Bestimmung als diagnostischer Indikator in der Früherkennung bei einigen tumorigenen Entartungen dienen, darunter Tumore der Haut, des Pankreas und des kolorektalen Bereichs CRC ([130], zur Übersicht [48]).

Auch bei einigen nicht-malignen Erkrankungen trägt FGF-BP zu der Entstehung bzw. Progression von pathophysiologischen Veränderungen bei. So wurde erst kürzlich eine Beteiligung von FGF-BP am neurodegenerativen Prozess der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) beschrieben, wobei es in die Regulation von miRNAs (miR-206) eingreift [156]. Ferner ist eine Änderung der FGF-BP-Expression in Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen der Niere beschrieben. Bei Kindern wird infolge der Gewebsregeneration nach einem sog. Hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) im Tubulusepithel

16) Detaillierte Expressionsanalysen von FGF-BP über die Nachweismethoden Northern blot, ISH, IHC sowie RT-PCR finden sich bei den nachfolgend genannten Referenzen [128, 144, 147, 152, 153].

17) Der Phänotyp dieser Mutante eignet sich gut als Modellorganismus für intestinale Tumore ([154], Details siehe Abschnitt 1.5).

eine Hochregulation von FGF-BP gefunden [157] und im Verlauf einer sog. HIV-assoziierten Nephropathie (HIV-HUS) bestehen ebenfalls erhöhte FGF-BP-Spiegel [158]. Ein Proteinnachweis bei diesen Patienten zeigt eine vermehrte Ausscheidung von sekretiertem FGF-BP über den Urin.

1.12.4 Regulation der FGF-BP-Expression

Mehrere Studien belegen, dass die FGF-BP-Expression vielfältigen Mechanismen unterliegt und durch verschiedene Zytokine sowie Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird. Bei der Genregulation spielen unterschiedliche Promotorelemente sowie proteinbindende DNA-Domänen eine Rolle.

Positive Regulatoren der FGF-BP-Expression

Wie bereits erwähnt, wird FGF-BP durch β -Catenin induziert [47]. Außerdem ist *FGF-BP* ein direktes *target*-Gen von KLF-5 (*Krüppel-like factor 5*) [150, 159]. Dieser Transkriptionsfaktor, der u.a. in die Genexpression der anti-apoptotischen Faktoren Pim-1 [160] und Survivin [161] eingreift, fungiert in mehreren Brustkrebszelllinien als positiver FGF-BP-Regulator auf transkriptioneller sowie translationaler Ebene. Tumorpromotoren wie der Phorbol-ester TPA (12-*o*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) bewirken eine direkte, PKC- sowie KLF-5-abhängige transkriptionelle Hochregulation von *FGF-BP* in verschiedenen Mamma- sowie Zervixkarzinomzellen [150, 162]. In humanen Keratinozyten erfolgt auf eine Induktion von Hautpapillomen durch DMBA (9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracen) eine verstärkte FGF-BP-Expression [143]. In *in vitro*-Assays stimuliert fetales Kälberserum (FCS) die FGF-BP-Expression unter bestimmten Kulturbedingungen in verschiedenen Plattenepithelzellen sowie Keratinozyten [155, 163]. Diese Hochregulation verläuft in postmitotischen ME-180-Zellen PKC-, MEK/ERK- und p38-abhängig. Auch EGF aktiviert den FGF-BP-Promotor, in ME-180 über eine p38- sowie MEK1/2-vermittelte, in MDA-MB468 über eine PKC- sowie p38-abhängige Signaltransduktion [149, 164]. Dabei spielen die Promotorelemente AP-1 (c-Fos/ JunD), Sp1 sowie C/EBP eine wichtige Rolle. Darüber hinaus wirkt TGF α als positiver FGF-BP-Regulator in HaCaT-Keratinozyten [163]. Stöppler *et al.* ermittelten ferner, dass der FGF-BP-Promotor durch das HPV16 *E6*-Onkogen aktiviert wird, was in nicht-immortalisierten humanen Vorhaut-Keratinozyten zur transkriptionellen sowie translationalen FGF-BP-Hochregulation führt [165]. Desweiteren führt eine wiederholte Verabreichung der Antidepressiva Desipramin und Fluoxetin zu einem Anstieg von FGF-BP in Neuronen des zerebralen Kortex und in Astrozyten im Hippocampus [166]. Rosini *et al.* untersuchten in einem Sexualhormonsensitiven Prostatakarzinom-Modell die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem FGF-Signaling und der Androgen-Aktivität besteht. Dabei wurde ermittelt, dass eine stabile Überexpression des Androgen-Rezeptors (AR) in PC-3-Zellen *FGF-BP* induziert und zu einer vermehrten Freisetzung von FGF-BP, FGF2 und FGF7 führt [167].

Negative Regulatoren der FGF-BP-Expression

Retinoide (natürlich vorkommende Vitamin-A-Verbindungen sowie deren synthetische Analoga) werden in der Forschung häufig eingesetzt, um die Progression verschiedener Neoplasien zu inhibieren (zur Übersicht [168]). In mehreren Tumormodellen wirken Vitamin-A-Derivate als negative Regulatoren der FGF-BP-Expression auf transkriptioneller sowie post-transkriptioneller Ebene [137, 169-171]. Liaudet-Coopman *et al.* ermittelten bei mehreren Plattenepithelkarzinomzellen eine Reduktion der FGF-BP mRNA von 40-90% innerhalb von 24 h nach einer Behandlung mit Tretinoin (Vitamin A-Säure, syn. all-trans-Retinsäure) [171]. In ME-180-Zellen ist dieser Effekt bereits 24 h nach Tretinoin-Entzug wieder aufgehoben. Desweiteren unterdrückt der Tumorsuppressor Fbw7 die KLF-5-induzierte FGF-BP-Expression in mehreren Brustkrebszelllinien [172]. Ferner zeigten Sherif *et al.*, dass die Überexpression von p53 zeitabhängig zu einer Herunterregulation von FGF-BP in JSQ3-Kopf-Hals-Tumorzellen führt [173]. Zwei Studien mit Mesenchym- sowie Neuralleistenzellen belegen, dass TGF- β die Transkription von *FGF-BP* reprimiert. Mechanistisch erfolgt diese Genregulation über die Transkriptionsfaktoren Smad2/3 [163, 174].

1.12.5 Wirkmechanismus und Interaktionspartner

Der bislang bekannte Wirkmechanismus von FGF-BP als Bioaktivator für Fibroblasten-Wachstumsfaktoren basiert auf einer extrazellulären Funktionsweise. FGF-BP bindet reversibel und nicht-kovalent an mehrere FGFs, darunter FGF1, FGF2, FGF7, FGF10 und FGF22 [128, 129, 133, 163]. Die Wechselwirkung zu dem Bindepartner FGF2 ist die am intensivsten untersuchte Protein-Protein-Interaktion von FGF-BP. Die für die Bindung an FGF2 minimal notwendige Interaktionsdomäne liegt im C-Terminus von FGF-BP [175] und wird infolge einer kompetitiven Verdrängung durch FGF1, Heparin/HSPGs sowie Anti-FGF-BP-Antikörper konzentrationsabhängig antagonisiert [130, 176]¹⁸. FGF-BP löst FGF2 konzentrationsabhängig aus der Zellmatrix-Assoziation und überführt es in eine aktive Form [176]. Auf diese Weise gelangt FGF2 zu seinem Rezeptor (FGFR) (Abb. 2b). FGF-BP spielt somit eine wichtige Rolle in der FGF/FGFR-Signaltransduktion [129, 147, 152, 176, 177]. Ferner schützt es FGF2 vor einem proteolytischen Abbau sowie einer Inaktivierung durch Säuren [128].

Die Wirkweise von FGF-BP ist essentiell an den strukturellen Aufbau der EZM gebunden. Nach der Proteinbiosynthese in den Ribosomen und der Sekretion in den Interzellularraum bindet FGF-BP mit hoher Affinität an makromolekulare Bestandteile der EZM (u.a. Heparin und Perlekan) [144]. Die

18) Die für die Interaktion notwendigen Bindedomänen von FGF-BP an die weiteren FGF-Bindepartner wurden bislang nicht untersucht. Vermutlich liegen diese aber *nicht* im C-Terminus, da die verkürzte 17kDa-Form von FGF-BP ebenfalls an diese FGFs bindet [163]

für die Protein-Matrix-Interaktion notwendigen Aminosäuren liegen im Bereich zwischen Arg¹¹⁰ und Phe¹⁴³ [132]. Die extrazelluläre Funktion von FGF-BP als *Carrier*-Molekül für FGFs wird wesentlich von der Art und Beschaffenheit einzelner Zellmatrixkomponenten gesteuert. Newman *et al.* ermittelten, dass in ATII-Zellen die FGF-BP-Expression stark vom Sulfatierungsgrad der Proteoglykane (HSPGs) abhängt. So korreliert die FGF-BP-Expression mit der Aktivität des Enzyms NDST-1¹⁹. Die FGF-BP-mRNA ist hochreguliert, sobald die Syntheserate an sulfatierten Proteoglykanen steigt [181].

Neben der oben beschriebenen extrazellulären Rolle von FGF-BP als Bioaktivator für FGFs wird vermutet, dass das Protein eine weitere, bisher nicht bekannte intrazelluläre Funktion entfaltet. Dies ist auf die Beobachtung von Abuharbeid zurückzuführen, welcher ermittelte, dass bei der Koexpression von FGF-BP mit FGF2 beide Proteine gemeinsam in den Zellkern translozieren [182] (Abb. 2a).

1.12.6 Biologische Effekte von FGF-BP

FGF-BP ist ein essentielles Gen für die Embryonal- und Neuronalentwicklung. Ferner fördert es die Wundheilung. Insbesondere bei neoplastischem Wachstum spielt es eine wichtige Rolle, da es in die Angiogenese, die DNA-Synthese und das zelluläre Überleben eingreift. Mehrere Studien verweisen auf die strikte Abhängigkeit der durch FGF-BP hervorgerufenen Effekte von der Konzentration des Proteins (Details s.u.).

In den entwicklungsbiologischen Modellorganismen des Haushuhns sowie des Zebrafischs wurde nachgewiesen, dass FGF-BP (bzw. FGF-BP-Homologe) für die Embryonalentwicklung und das zelluläre Überleben essentiell ist/sind [138, 139]. Der *knockdown* der FGF-BP-Hühnerhomologen chBP1 und chBP2 verursacht schwere Entwicklungsstörungen mit einer erhöhten Letalität von Embryonen im *ex ovo*-Modell [138]. Die transgene Überexpression von humanem FGF-BP führt in diesem Modell hingegen ebenfalls zu starken vaskulären Schäden, Hämorrhagien sowie einer erhöhten Letalitätsrate [183]. Auch in der neuronalen Entwicklung spielt FGF-BP eine wichtige Rolle. Dies wurde im neuronalen Differenzierungsmodell an sog. PC12-Zellen [184] untersucht [177]. Nach Verletzungen des Rückenmarks steigt die FGF-BP-Expression in den geschädigten neuronalen Fasern und Zellkörpern ipsilateral zur Läsion gelegenen Seite stark an, nicht jedoch im unverletzten kontralateral gelegenen Gewebe [177]. Dieser Anstieg verläuft zeitlich parallel zu der Hochregulation von FGF2. Tassi *et al.* zeigten, dass exogen zugesetztes FGF-BP die FGF2-induzierte zelluläre Überlebensrate erhöht und das Neuritenwachstum induziert [177].

19) Die Sulfatierung von Proteinen, eine u.a. durch die N-Deacetylase/N-Sulfotransferase-1 (NDST-1) katalysierte Reaktion, ist eine für die Zelle überlebenswichtige Modifizierung zentraler EZM-Komponenten. Die Aktivität dieses Enzyms für ein funktionierendes FGF-Signaling essentiell [178-180]. NDST-1 *knockout*-Mäuse sterben, da der physiologische Sulfatierungsgrad der EZM (insbesondere der Basallamina) nicht aufgebaut werden kann.

Nach Verletzungen der Haut steigt die Genexpression von *FGF-BP* innerhalb weniger Stunden rasch an (sog. *primary-response*-Gen, [137, 143, 163, 177]). FGF-BP stimuliert den Heilungsprozess, da es die Freisetzung von FGFs im Bereich der Wunde erhöht [142, 163]. Mit einer fortschreitenden Wundheilung sinkt die Genexpression jedoch allmählich wieder ab, so dass nach einem vollendetem Wundverschluss wieder das Ausgangsniveau erreicht ist. Beer *et al.* ermittelten, dass in Keratinozyten der mitogene und wundheilungsfördernde Effekt von FGF7 durch FGF-BP konzentrationsabhängig moduliert wird [163]. Bei hohen FGF7-Konzentrationen übt FGF-BP keinen proliferationsfördernden Effekt aus. Die Wirkung von geringen FGF7-Konzentrationen wird durch FGF-BP hingegen verstärkt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass in Normalgewebe, nicht aber in malignen Zellen, FGF-BP eine dosisabhängige, zweigeteilte biologische Wirkung aufweist. Während niedrige Proteinkonzentrationen die DNA-Neusynthese induzieren, so wirken hohe FGF-BP-Level eher inhibierend auf die Syntheserate [185].

FGF-BP wirkt als angiogener und koloniestimulierender Faktor [147, 151, 152]. Chen *et al.* ermittelten einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der FGF-BP-Expression und der Blutgefäßdichte in Gewebeschnitten von humanen Plattenepithelkarzinomen [186]. Desweiteren zeigten Liaudet-Coopman *et al.* im Xenograft-Modell, dass eine Behandlung von Mäusen mit Tretinoin die FGF-BP-Expression in den Tumoren drastisch reduziert [169]. Parallel dazu erfolgt eine Inhibition der Angiogenese. Im Hühner-Chorioallantoismembran(CAM)-Assay wurde gezeigt, dass FGF-BP die Neovaskularisierung fördert, da es zu einer konzentrationsabhängigen Freisetzung von FGF2 führt [176]. Die transgene Überexpression von FGF-BP in FGF-BP-negativen SW-13-Zellen stellt im Xenograft-Modell einen begrenzenden Faktor für die Etablierung solider Tumore in Nacktmäusen dar [152]. Umgekehrt resultiert aus einer Verminderung der FGF-BP-Expression in natürlicherweise hoch-exprimierenden LS174T sowie ME-180-Zellen ein starker anti-tumorigener Effekt. FGF-BP wird daher als ein „angiogenes Switch-Molekül“ bezeichnet [147]. Mit Hilfe des zeitlich gut steuerbaren Tet-off-Genexpressionsystems wurde nachgewiesen, dass der wachstumsfördernde Beitrag von FGF-BP insbesondere in dem frühen Stadium der Tumormorphogenese von Bedeutung ist [187]. Eine Induktion der transgenen Expression zu einem späteren Zeitpunkt nach Ausbildung solider Tumore übt hingegen keinen signifikanten proliferativen Effekt mehr aus.

Im Kontrast zu den genannten pro-tumorigenen Wirkungen von FGF-BP steht hingegen eine Studie von Sauter *et al.* [131]. Die Arbeitsgruppe konnte *keine* Korrelation zwischen der Genexpression und der Tumorstadium bzw. Neovaskularisierung feststellen. In mehreren Plattenepithelien wurde eine Abnahme der FGF-BP-Spiegel mit zunehmender Progression von Tumorzellen in einen invasiven Phänotyp beobachtet.

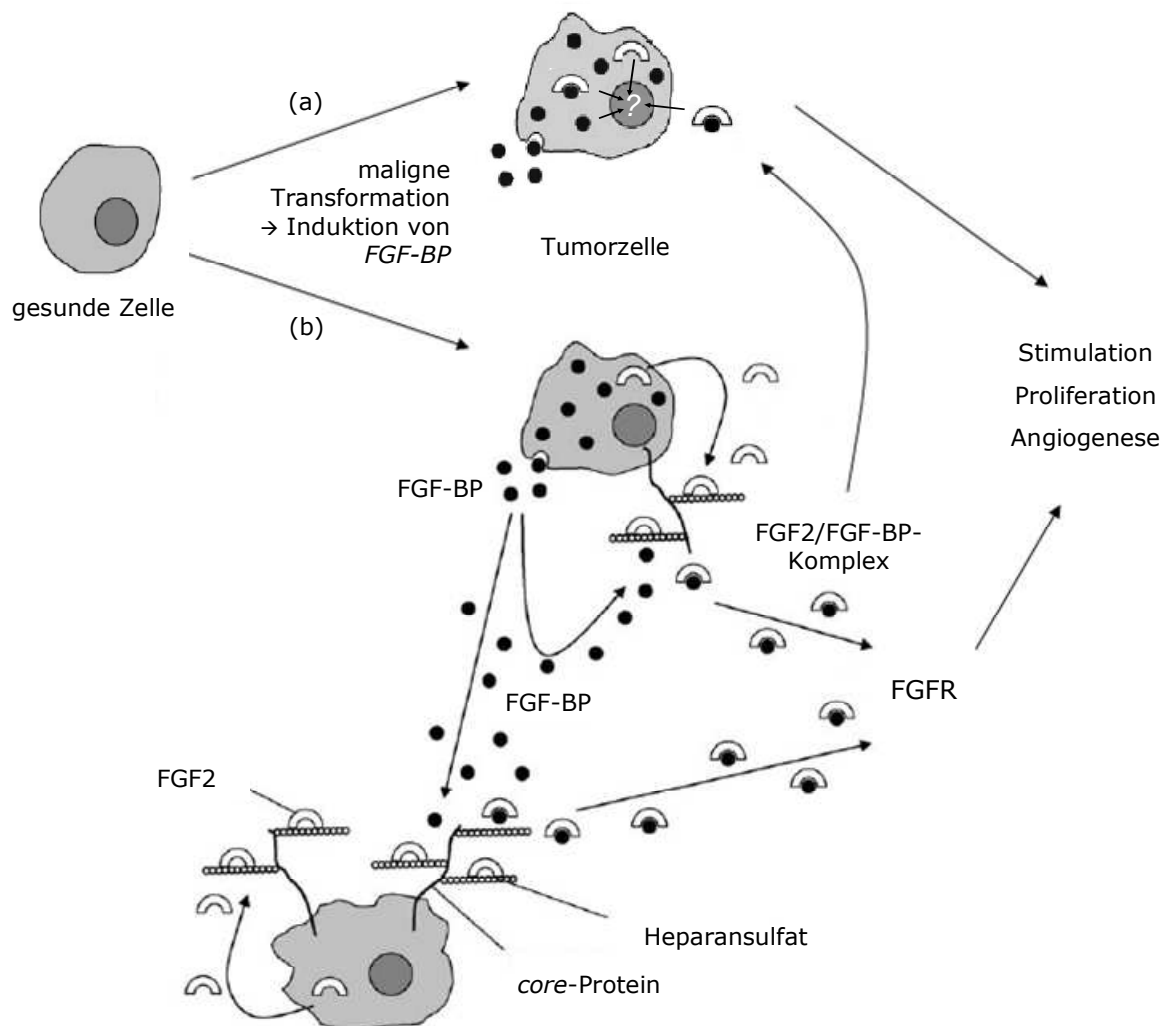


Abb. 2: Modell zu den Wirkmechanismen von FGF-BP (modifiziert nach Abuharbeid [140]).

(a) Hypothese der intrazellulären Funktion von FGF-BP. Nach der transgenen Koexpression von FGF-BP mit FGF2 erscheinen beide Proteine im Zellkern [182]. Die Translokation findet auf bisher ungeklärte Weise statt. Sie passiert entweder in Form eines intrazellulär gebildeten Protein-Protein-Komplexes oder durch eine zelluläre Wiederaufnahme beider Interaktionspartner nach einem in (b) beschriebenen Mechanismus.

(b) Extrazellulärer Wirkmechanismus von FGF-BP am Beispiel der Interaktion mit FGF2. FGF-BP wird sekretiert (beispielsweise aus einer Tumorzelle) und bindet an FGF2, welches in der EZM der gleichen oder einer anderen Zelle immobilisiert ist. Dadurch wird FGF2 aus der Heparansulfat-Proteoglykan-Bindung freigesetzt und in eine lösliche Form überführt. FGF-BP fungiert somit als biologisches Carrier-Protein. FGF-BP bioaktiviert FGFs, transportiert sie zu ihrem Zielrezeptor (FGFR) und katalysiert dadurch ein FGF/FGFR-Signaling (autokrine bzw. parakrine Stimulation).

1.13 HMG-Proteine

Die Superfamilie der HMG-Proteine umfaßt eine Gruppe von ubiquitären, kleinen Nicht-Histon-Kernproteinen, welche in die Chromatinorganisation involviert sind. Ihre Wirkung basiert auf einer räumlichen Neuordnung der DNA in den Nukleosomen, so dass man sie als architektonische Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Durch ihre Bindung induzieren sie definierte Sekundärstrukturen in der DNA, was für die Expression einer Vielzahl von Genen sowohl negative als auch positive Auswirkungen zur Folge hat. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation von DNA-abhängigen Prozessen wie Transkription, Replikation und DNA-Reparatur. Die Einteilung der HMG-Proteine erfolgt in die drei Hauptklassen HMGA (früher HMGI/Y/C), HMGB (früher HMG1/2) und HMGN (früher HMG14/17). Die Zuordnung in die jeweiligen Klassen richtet sich nach dem Vorhandensein von charakteristischen funktionellen Elementen [188]. Diese Elemente werden auch in anderen nukleären Faktoren, sog. *HMG-motif proteins* vorgefunden. Spezifisches Kennzeichen von HMGB-Proteinen ist die sog. HMG-Box, von HMGN-Proteinen die nukleosomale Bindungsdomäne. Ein gemeinsames Strukturmerkmal aller HMG-Proteine ist der C-Terminus, welcher sich durch einen erhöhten Anteil an sauren Aminosäuren auszeichnet. Bedingt durch ihre geringe Größe (<30kDa) sowie hohe Ladungsdichte weisen alle Mitglieder dieser Proteinfamilie eine enorme elektrophoretische Beweglichkeit auf, was zu ihrer Namensgebung führte (HMG=*High-Mobility Group*, zur Übersicht [189]).

- *HMGA*:

HMGA-Proteine verfügen als charakteristische DNA-Bindedomänen über sog. *AT-Hooks*. Das palindromische Peptidmotiv eines AT-Hooks besteht aus einem invarianten Glycin- sowie Argininreichen Kern (Pro-Arg-Gly-Arg-Pro) und bindet an die kleine Furche AT-reicher Sequenzen der DNA in der B-Form. Dabei ist eine bestimmte *Form* der Nukleinsäure ausschlaggebender als eine spezifische *Sequenz*. Nur im Zustand der DNA-Assoziation erhält HMGA eine stabile Konformation. In Lösung liegt das Protein hingegen ohne definierte Sekundärstruktur vor (hohe intrinsische Flexibilität in der Peptidkette, sog. *disordered-to-ordered-Transition*). Zwar verfügt HMGA selbst über keine transkriptionelle Aktivität *per se*, doch durch die Bindung der drei *AT-Hooks* jedes Proteins an die DNA kann diese partiell entwunden bzw. zu Schleifen geformt werden, was die koordinierte Assemblierung des stereospezifischen *Enhanceosom*-Komplexes, welcher bei *trans*-regulierten Proteinen essentiell ist, begünstigt (zur Übersicht [189]). In Säugern werden die zwei Subfamilien HMGA1 mit den Splicevarianten HMGA1a, HMGA1b und HMGA1c (vormals HMGI, HMGY, HMG-I/R) und HMGA2 (vormals HMGI-C) voneinander unterschieden. HMGA begünstigt eine onkogene Transformation und ist in vielen malignen Tumoren überexprimiert ([190], zur Übersicht [191]). In ausdifferenziertem Gewebe sowie post-mitotischen, nicht proliferierenden Zellen ist es hingegen kaum nachweisbar [192]. In MiaPaCa2-Zellen führt die stabile HMGA-Überexpression zu einer konstitutiven Akt-Aktivierung [193]. Die in dieser Arbeit untersuchte Zelllinie ME-180 exprimiert HMGA beispielsweise stark [194].

1.14 Methoden der Stummschaltung von Genen

Neben Rekombinationstechniken in der Keimbahn, welche zu einem kompletten Verlust und damit zum vollständigen Abschalten eines Gens führen²⁰ (sog. *knockout*), stehen eine Reihe weiterer molekularbiologischer Werkzeuge zur Verfügung, um selektiv in die Genexpression einzugreifen. All diesen Methoden ist gemein, dass sie die Genaktivität *nach* der Transkription (post-transkriptional) beeinflussen. Dabei werden enzymatische von nicht-enzymatischen Verfahren unterschieden. Im Gegensatz zur sog. Antisense-Technologie, bei welcher komplementäre Oligonukleotide (ODN) rein stöchiometrisch an eine ZielfmRNA (*target*-mRNA) binden und dadurch deren weitere Translation unterbinden²¹, beruht die Funktionsweise von Ribozymen und siRNAs auf einem katalytischen Mechanismus (s.u.). Bei Ribozymen stellen die Nukleinsäuren selbst das biologisch aktive Molekül dar (*Ribonukleinsäure-Enzym*). Bei siRNAs ist die katalytische Aktivität hingegen an einen zellulären Enzymkomplex gekoppelt. Aufgrund der katalytischen Wirkweise sind siRNAs den Antisense-Verbindungen gegenüber zumeist überlegen. So zeigen IC₅₀-Werte von siRNAs eine studienabhängig um ~2-3 Log-Stufen höhere Potenz als „vergleichbare“ Antisense-Moleküle. Dies ist selbst bei Verwendung von modifizierten und nukleaseresistenten Nukleinsäureanaloga zu beobachten. Allerdings sind ebenso Untersuchungen zu berücksichtigen, welche auf die strikte Abhängigkeit der Wirkeffizienz von der Sekundärstruktur der *target*-mRNA hinweisen, so dass bei einer sterisch unzugänglichen Konformation des *targets* die kleinen Antisense-Moleküle im Einzelfall ggf. besser wirksam sein können als siRNAs. Dies lässt sich damit begründen, dass siRNAs auf die Kooperativität von großen Proteinkomplexen angewiesen sind, was den erhöhten Raum in Anspruch erklärt [195-198].

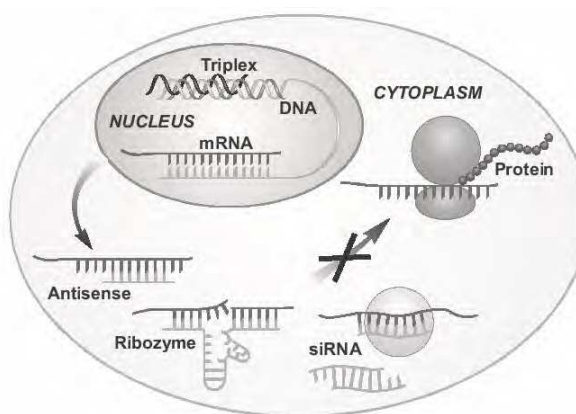


Abb. 3: Übersicht über Möglichkeiten der Inhibition von Genen mittels OMGS (Oligonukleotide-Mediated Gene Silencing, übernommen von Brus et al. [199]). Angriffspunkt aller post-transkriptionell wirksamen trigger-Moleküle (Antisense-Nukleinsäuren, Ribozyme, siRNAs) ist die mRNA eines gegebenen Gens. Durch sequenz-spezifische Wechselwirkungen wird eine Umschreibung zum Protein verhindert, indem die Translation entweder inhibiert oder die mRNA enzymatisch zerstört wird.

20) Beispielsweise die Cre/loxP-Technologie.

21) Durch die sterische Hinderung am Ribosom bzw. Aktivierung von RNase H.

1.15 RNA Interferenz (RNAi)

1.15.1 Mechanismus der RNAi

RNA Interferenz (RNAi) ist ein stark konservierter, in allen eukaryotischen Zellen natürlich vorkommender Mechanismus, der einen wichtigen Prozeß bei der Genregulation darstellt. Schlüssel-moleküle sind kleine, nicht-translatierte RNA-Moleküle, welche selektiv die Expression bestimmter Gene beeinflussen, indem sie an ihre Zielstruktur, die mRNA, binden. Die kurzen RNAs sind entweder exogener Herkunft (siRNAs) oder werden von der Zelle selbst produziert (shRNAs bzw. miRNAs). Zum einen stellt die RNAi einen Abwehrmechanismus der Zelle dar, um auf exogene und potentiell gefährliche Nukleinsäuren zu reagieren (z.B. virale Transkripte). Diese werden dadurch als wirtsfremd erkannt und antagonisiert. Desweiteren spielt der endogene RNAi-Vorgang eine zentrale Rolle bei Entwicklungsvorgängen sowie der Steuerung physiologischer Prozesse (zur Übersicht [200, 201]).

Der Ablauf der RNAi unterliegt einem katalytischen Mechanismus, bei dem kurze doppelsträngige siRNAs als Effektormoleküle fungieren. Diese bewirken die Aktivierung eines zelleigenen Multi-enzymkomplexes mit Nukleaseaktivität, des sog. RISC (*RNA-induced silencing complex*). Zielstruktur des aktivierten RISC ist die mRNA, welche zu einer gegebenen siRNA komplementär ist. In der Folge wird das betroffene Gen stummgeschaltet, was im Falle von siRNAs durch nukleolytische Zerstörung der mRNA geschieht, bei miRNAs hingegen zumeist durch Hemmung der Translation (Details s.u.). Da dieser Vorgang *nach* der Transkription stattfindet, wird RNAi auch als *posttranskriptionelles Gen-silencing*“ (PTGS) bezeichnet, ist jedoch auch unter dem Begriff „*Co-Suppression*“ bekannt. RNAi gliedert sich in zwei Abschnitte. In der ersten sog. Initiationsphase erkennt die Nuklease *Dicer* lange, doppelsträngige RNA-Moleküle als Substrat und schneidet sie in kürzere Fragmente [202, 203]. Die entstehenden 21-25nt. langen RNA-Moleküle werden als siRNAs (*short interfering RNAs*) bezeichnet und stellen die eigentlichen Effektormoleküle der RNAi dar [204]. Diese sind, wie sämtliche RNase III-Spaltprodukte, 5'-terminal phosphoryliert und weisen 3' einen 2nt. langen *OH*-Überhang auf [205, 206]. In der folgenden Effektorphase wird RISC mit dem sog. *guide-strand* der siRNA, dem thermodynamisch weniger stabilen *antisense*-Strang des Duplex-Moleküls beladen und dadurch aktiviert [207]. Der verbleibende *sense-strand* (=passenger-Strang) hat kein katalytisches Potential. Durch sequenzspezifische Watson-Crick-Basenpaarung bindet die nun einzelsträngige siRNA über die sog. *seed-region* an ihr Komplement und bringt dadurch den katalytischen Part von RISC (*Slicer*) in große räumliche Nähe zur *target*-mRNA, was deren endonukleolytische Spaltung²² zur Folge hat [213].

22) Bei diesem Vorgang spielen die Argonaut-Proteine wichtige Schlüsselrollen. In Säugerzellen ist zwar Ago2 für den Großteil der „*Slicer*“-Aktivität verantwortlich [208], jedoch ist das isolierte Protein allein nicht in der Lage, die Zertrennung der mRNA durchzuführen. Hierfür ist die kooperative Aktivität *aller* RISC-Komponenten notwendig [209-212]).

Die zerschnittene mRNA wird intrazellulär rasch durch endogen ubiquitär vorkommende Nukleasen abgebaut, wodurch sie für eine weitere Translation nicht mehr zur Verfügung steht. Der aktivierte RISC diffundiert darauf hin von seinem Substrat ab und kann den geschilderten Prozeß an weiteren mRNA-Molekülen wiederholen.

Natürlicherweise verfügt jede eukaryontische Zelle über die katalytische RNAi-Maschinerie. Damit ist es möglich, eine selektive Herunterregulation (*downregulation*) von Genen auf posttranskriptioneller Ebene durchzuführen. RNAi kann *in vitro* und *in vivo* durch siRNAs künstlich induziert werden. Sie stellt daher ein wichtiges Werkzeug in der Forschung dar, da über das gezielte Eingreifen in die Expression funktionelle *loss-of-function*-Analysen von Genprodukten möglich werden. RNAi kann experimentell erzwungen werden, entweder indem man die siRNA exogen verabreicht (z.B. durch Transfektion) oder die Zelle dazu veranlaßt, die katalytisch aktiven Nukleinsäuren selbst herzustellen (Details siehe Abschnitt 1.15.2). Ferner hat sie als gentherapeutische Methode großes Potential in der Behandlung von Krankheiten, welche mit der pathologischen Hochregulation bestimmter Gene einhergehen. 2006 wurde den amerikanischen Wissenschaftlern Andrew Fire und Craig Mello für ihre grundlegenden Arbeiten auf dem Gebiet der RNAi der Medizin-Nobelpreis verliehen [214].

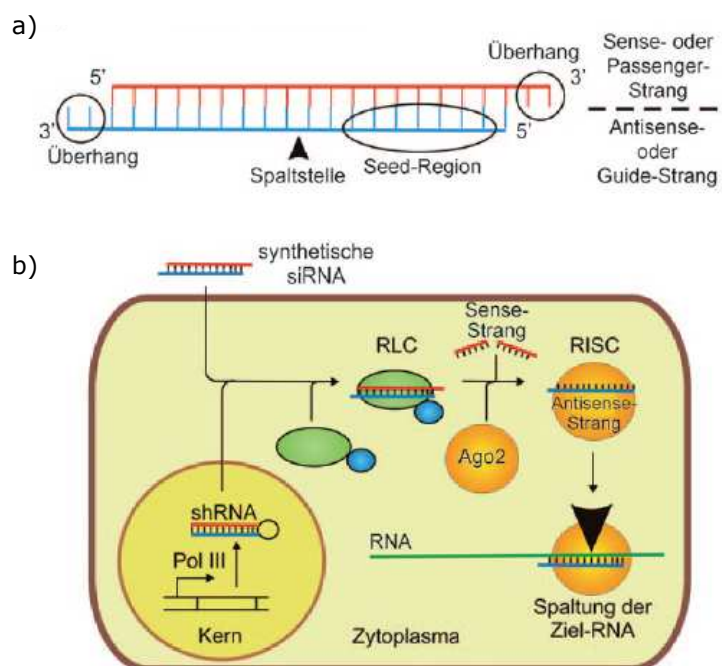


Abb. 4: Übersicht über den Ablauf der RNAi (übernommen von Kurreck [215]).

(a) Struktur einer siRNA: Das kurze Duplexmolekül besteht aus zwei zueinander komplementären Sequenzen sowie zwei einzelsträngigen 3'-terminalen Überhängen (sticky ends). Die Seed-Region im Antisense-Strang vermittelt die Wechselwirkung mit der target mRNA.

(b) vereinfachter Mechanismus der RNAi. Die katalytisch aktive RNA ist entweder exogener Herkunft (Transfektion einer siRNA) oder wird von der Zelle selbst hergestellt (Transkription einer shRNA). Nach der Aufnahme der siRNA in den RISC-Loading Complex (RLC) erfolgt deren enzymatische Zersetzung in zwei Einzelstränge durch die Nuklease Dicer. Die RISC-Komponente Ago2 katalysiert die Spaltung der zum Antisense-Strang komplementären mRNA.

1.15.2 Vektorbasierte RNAi

Die sog. vektorbasierte RNAi eignet sich gut, um siRNAs in einer Zelle zu generieren. Das Verfahren beruht auf der intrazellulären Anwesenheit einer Expressionskassette, welche für ein kurzes RNA-Transkript kodiert und durch entsprechende regulative Sequenzen steuerbar ist. So kann ein viraler Vektor oder transfizierte Plasmid-DNA mit geeigneten Promotoren dazu dienen, die Expression von sog. shRNAs (*small-hairpin* RNAs) zu steuern [216-219]. Details zum Aufbau sowie zur Funktionsweise von shRNAs finden sich in Abschnitt 3.2.6.9.

1.15.3 RNAi-basierte Krebstherapie und gentherapeutische Strategien

Die Entdeckung, dass mit siRNAs eine potente Möglichkeit geschaffen wurde, um auf zellulärer Ebene den gezielten *knockdown* bestimmter Gene herbeizuführen, weckt große Hoffnungen auf ein neues therapeutisches Werkzeug in der Behandlung von Krankheiten. siRNAs werden von der Zelle als direkte *Dicer*-Spaltprodukte angesehen und führen damit zur unmittelbaren Induktion der endogenen RNAi-Maschinerie. Herstellung und Design der siRNAs stellen einen essentiellen Schritt für den Erfolg von RNAi-Experimenten dar. Sie werden entweder von der Zelle selbst produziert (shRNAs, siehe Abschnitt 3.2.6.9) oder exogen zugesetzt (Transfektion). Eine Methode zur enzymatischen Herstellung ist die sog. *in vitro*-Transkription [220, 221]. Dieses vergleichsweise kostengünstige Verfahren ermöglicht zwar die Anreicherung großer RNA-Mengen, jedoch ist die therapeutische Anwendung derart erhaltener RNA-Moleküle problematisch. Die so erhaltenen siRNAs sind äußerst heterogen in der Zusammensetzung und führen zur Stimulation des angeborenen Immunsystems (*i.e.* Aktivierung von *Toll-like* Rezeptoren, TLRs, verbunden mit der Ausschüttung von Interferonen) [222]. Eine Möglichkeit, den Interferon-*Pathway* und die damit verbundene Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine zu umgehen, besteht in der Verwendung definierter, chemisch synthetisierter siRNAs >30 nt. [223, 224]. Um die katalytische Wirkung einer siRNA mit hoher Wahrscheinlichkeit voraussagen zu können, wurden zahlreiche Untersuchungen zur Sequenzoptimierung durchgeführt ([225-227], zur Übersicht [228-232]). Dazu stehen mittlerweile eine Vielzahl von computerbasierten Hilfsmodulen zur Verfügung. Ungeachtet dessen muss jede Sequenz im Einzelnen hinsichtlich ihrer *knockdown*-Effizienz getestet werden, da die o.g. Anforderungen empirisch ermittelt wurden und im Einzelfall von den allgemeinen Vorgaben zum rationalen siRNA-Design abweichen können. Ferner sind sog. *off-target* Effekte zu berücksichtigen. Diese durch die Nukleinsäuren vermittelten unerwünschten Effekte beruhen auf der (partiellen) Homologie der siRNA-Sequenz mit weiteren humanen bzw. speziesspezifischen Transkripten und können zu massiven Nebenwirkungen führen [233-236]. Jede siRNA muss daher hinsichtlich ihrer Nukleotidabfolge genauestens untersucht werden, um den *knockdown* nicht-gewünschter Gene auszuschließen.

Der Vorteil kurzer doppelsträngiger Ribonukleinsäuren ist, dass sie exogen appliziert werden können und im Unterschied zu viralen Gentransfer-Systemen nicht die Gefahr einer Integration ins Genom bergen (sog. Insertionsmutagenese). Jedoch ist der mit siRNAs erzielte Effekt nur von kurzer Dauer (transient). Bei einer siRNA-Therapie ist daher eine mehrfach wiederholte Gabe der spezifischen siRNA notwendig, um langfristige Effekte zu erzielen. Die großtechnische Synthese von siRNAs ist bislang noch relativ aufwändig. Beide RNA-Stränge müssen einzeln (*i.e.* voneinander getrennt) synthetisiert und anschließend *richtig* zusammengefügt (*annealt*) werden. Dies stellt vergleichsweise hohe Anforderungen an den Syntheseprozess dar und erschwert derzeit (noch) die Voraussetzungen für eine Zulassung zur Anwendung am Menschen.

Eine zielgerichtete Freisetzung (sog. *Delivery*) der siRNA in das gewünschte Gewebe bzw. Organ ist der entscheidende Faktor bei allen auf RNAi basierenden Therapiestrategien (sog. *targeting*). Unabhängig von ihrer Länge sind Nukleinsäuren kaum dazu in der Lage, intakte Biomembranen aktiv zu überschreiten und so in lebende Zellen einzudringen. Transfektionsreagenzien für siRNAs ermöglichen es zwar, RNAi-Experimente unter *in vitro*-Bedingungen relativ leicht durchzuführen²³, *in vivo* ist die Situation hingegen komplexer und wird aktuell derzeit in zahlreichen Studien näher untersucht. Ziel ist es, die therapeutischen Nukleinsäuren vor einem Abbau zu schützen, damit sie am Wirkort in ausreichender Menge vorliegen. Zelluläre Aufnahme sowie intrazelluläre vesikuläre Freisetzung stellen essentielle Voraussetzungen für die Wirksamkeit der siRNAs dar (zur Übersicht [237-240]). *In vivo targeting*-Strategien verfolgen daher meist eine oder eine Kombination der nachfolgend genannten Maßnahmen, um den gezielten siRNA-Transport zum Wirkort, längere Verweilzeiten im Körper und Erhöhung der Bioverfügbarkeit zu erreichen:

physikalische Methoden:

- z.B. Elektropulsation, Magnetofektion oder hydrodynamische Injektion

chemische Modifikation:

- Kopplung an bioreaktive *targeting*-Liganden, z.B. Antikörper, Peptide, Aptamere
- strukturelle Veränderungen, z.B. PEGylierung, peptidische Nukleinsäuren (PNAs) oder blockierte Nukleinsäuren (LNAs)

23) Die gewünschte Nukleinsäure muss lediglich mit einem Transfektionsreagenz versetzt werden; die Zugabe des Komplexes zur Zellkultur reicht damit aus, um die katalytische RNA zu ihrem Wirkort zu bringen.

galenische Maßnahmen:

- Formulierung in pharmazeutische *Carrier*, z.B. Liposomen oder fusogene Lipide, sog. Lipoplexe, z.B. SNALPS (*stable nucleic acid lipid particles*)
- Adsorption an kationische Komplexbildner sowie Bildung von Polymerkonjugaten, z.B. Polyethylenimin (PEI)
- Fusion der gewünschten Sequenz mit viralen Vektoren, z.B. Transduktion mit Hilfe von Adeno-assoziierten Viren (AAV)

1.16 Allgemeines zu rekombinanten Expressionssystemen

Die Wahl eines rekombinanten Expressionssystems richtet sich nach den Anforderungen an das zu produzierende Protein. So erhält man in Bakterienkulturen zwar in kurzer Zeit relativ große Mengen an produzierender Biomasse, wodurch zumeist auch hohe Ausbeuten möglich werden, jedoch sind Prokaryonten nur unzureichend in der Lage, posttranslationale Modifikationen korrekt durchzuführen. Bei Fragestellungen, welche *keine* Bioaktivität des Proteins zwingend erfordern, ist *E. coli* daher Wirtsorganismus der ersten Wahl, da mit vergleichsweise geringem apparativem sowie finanziellem Aufwand die Produktionsbedingungen schnell etabliert werden können. Zwar sind durch entsprechende Klonierungen auch in Bakterien bestimmte Proteinmodifikationen wie etwa der Einbau von gewünschten Signalsequenzen oder die gezielte Abspaltung bestimmter Aminosäuren von der Polypeptidkette (z.B. *Prä-Pro*-Proteine) möglich, die für Säugerzellen spezifischen Proteinfaltungen sind hingegen in *E. coli* nur eingeschränkt durchführbar. Ebenfalls ist es in Bakterien nur bedingt realisierbar, Disulfidbrücken gezielt auszubilden oder funktionelle Gruppen anzufügen (z.B. Phosphorylierung oder Ubiquitinylierung).

Arbeiten in Hefe-Expressionssystemen ermöglichen es, die Fähigkeiten eukaryotischer Organismen (korrekte Proteinfaltung sowie posttranslationale Proteinmodifikation) mit der einfachen Handhabbarkeit sowie hohen Expressionsrate von Bakterienkulturen zu kombinieren. Durch die Verwendung eines Sekretionssignals wird eine leichte Zugänglichkeit zum Protein gewährleistet, da das gewünschte Genprodukt im Expressionsmedium akkumuliert und so für eine direkte Aufreinigung zur Verfügung steht. Damit wird das Problem einer intrazellulären Anreicherung, welches häufig mit einer schlechten Löslichkeit einhergeht, umgangen. Die Hefe *Pichia pastoris* weist im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* dabei den Vorteil auf, sezernierte Glykoproteine nicht hyperzuglykosylieren (zur Übersicht [241, 242]).

Da FGF-BP über Glykosylierungsstellen verfügt, wurde zu dessen Gewinnung das *P. pastoris*-System (von Invitrogen) gewählt. Neben den o.g. Wirtsorganismen wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich eine rekombinante Proteinexpression in Sf-9 Insektenzellen sowie Säugerzellkulturen durchgeführt.

- *Expression von nicht-translatierten Nukleinsäuren*

Der Einbau von stabil transfizierter Plasmid-DNA unterliegt in jeder Einzelzelle einer zufälligen Integration in das Genom. Dadurch können wichtige zelluläre Gene zerstört werden. Diese Tatsache gestaltet die Durchführung von sog. *loss-of-function* Untersuchungen (beispielsweise mit Hilfe vektorbasierter RNAi oder Expressionsvektoren für Ribozyme) schwierig, da neben den spezifischen Effekten eines *knockdowns* auch ungewollte Transfektionsartefakte auftreten können. Die polyklonale Zellkultur (*batch culture*) eignet sich folglich zwar gut für eine (Über-)Expression von Proteinen, da in kurzer Zeit viele stabile Zellen generiert werden und so, insbesondere unter präparativen Aspekten, gute Produktionsbedingungen entstehen, für *knockdown*-Analysen ist diese Methode jedoch ungeeignet. Bei vektorbasierten *targeting*-Strategien ist aus den o.g. Gründen häufig eine klonale Selektionierung notwendig um Zellpopulationen aufzufinden, welche über die gewünschten Eigenschaften verfügen. Unter der Voraussetzung, dass geeignete Kontrollen mitgeführt sowie ausreichend viele Zellklone verwendet werden, ist die klonale Vorgehensweise insbesondere bei therapeutischen Fragestellungen vorteilhaft, da im Idealfall eine direkte Korrelation zwischen verändertem Expressionslevel und einem daraus resultierenden Phänotyp ermittelt werden kann (sog. Gen-Dosis-Effekt). Dieser Effekt ermöglicht es, in *in vitro*-Modellen auf zellulärer Ebene orthologe Assoziationen zwischen Geno- und Phänotyp aufzufinden und somit den biologischen Beitrag eines Proteins zu (pathologisch veränderten) Stoffwechselvorgängen zu bestimmen. Die Expression von nicht-translatierten Nukleinsäuren (shRNAs und Ribozymen) stellt daher ein wertvolles Werkzeug in der molekularen Tumorforschung dar.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation war die funktionelle und molekulare Charakterisierung eines Fibroblasten-Wachstumsfaktor bindenden Proteins (FGF-BP, FGF-BP1). Da der Wirkmechanismus von FGF-BP bisher nur teilweise bekannt ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Aufgabenstellungen näher untersucht, um den biologischen Beitrag des Proteins, insbesondere in Hinblick auf tumorigene Prozesse, besser zu verstehen:

- Entwicklung reproduzierbarer Strategien zur rekombinanten Expression von FGF-BP in verschiedenen Wirtsorganismen
- Ermittlung neuer Bindepartner von FGF-BP. Fokussierung auf die bisher unbeschriebenen Interaktionen mit Komponenten des Zellkerns
- Analyse der funktionellen Wirkung von FGF-BP in Tumorzellen durch:
 - (i) Aufbau eines robusten Systems zur selektiven Verminderung der FGF-BP-Expression durch auf RNA-Interferenz (RNAi)-basierenden Methoden sowie Anwendung eines bereits etablierten Ribozym-*targetings*
 - (ii) Untersuchung der biologischen Effekte, welche zeitabhängig nach einer FGF-BP-Depletion auftreten
- Evaluation von FGF-BP als potentielle Zielstruktur (*target*) in der Antitumorthherapie durch:
 - (i) Auffinden synergistischer Ansätze von therapeutischem Gen-*targeting* in Kombination mit bestehenden Behandlungsstrategien am Beispiel des Zervixkarzinoms (Chemoresistenz im *in vitro*-Modell)
 - (ii) Untersuchung eines potentiell antitumoralen Effekts durch FGF-BP-Reduktion in einem *in vivo*-Kolonkarzinom-Mausmodell

3 Material und Methoden

3.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Typbezeichnung/ Hersteller
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator, H+P
Brutschrank (Zellkultur)	Function Line Inkubator, Heraeus
Elisa Reader	ELx800, Bio-Tek
Thermocycler	GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer T3 Thermal Cycler, Biometra
Phosphorimager	Cyclone, PerkinElmer
Photometer	Nanodrop 1000, Peqlab
qRT-PCR-Maschine	LightCycler 2.0, Roche
Schüttelinkubator	Forma Scientific
Sterilbank	Hera Safe, Heraeus
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R, Heraeus Sorvall RC 5B, DuPont De Nemours

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt /Greiner Bio-One
Pipetten	Serologische Einmalpipetten, Sarstedt
Reagenz- und Zentrifugenröhren	Sarstedt/Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen /-platten	Sarstedt/ CELLSTAR Greiner Bio-One
qRT-PCR Zubehör	LightCycler Capillaries (20 µl), Roche

3.1.1 Kits, Marker, rekombinante Proteine und Enzymsubstrate

Rekombinante FGFs wurden von Natutec/LabGen geliefert, Proteaseinhibitoren stammten von Calbiochem/Merck (*Protease Inhibitor Cocktail Set III*) bzw. Roche (*Complete[®] Cocktail-Tablets*), jeweils EDTA-frei. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten sowie Größenstandards für DNA- bzw. Protein-gele wurden von Fermentas bezogen. Kits für die Isolierung von Nukleinsäuren sind in Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben. Der Luciferase-Assay sowie lumineszenzbasierte Apoptose-Kits stammten von Promega. Die Caspasesubstrate stammten von Enzo Lifesciences. Antibody Arrays wurden von RnD bezogen (*Proteome Profiler[®] human Apoptosis Array Kit* (ARY009) sowie *human Phospho-MAPK Array Kit* (ARY002, Details dazu siehe Abschnitt 3.2.5.12).

3.1.2 Chemikalien und Chemotherapeutika

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von den Firmen Roth, Sigma und Merck verwendet. Im Speziellen ist der Lieferant bzw. Hersteller im jeweiligen Methodenteil in Zusammenhang mit dem entsprechenden Verwendungszweck genannt. Chemotherapeutika wurden stets frisch von der Apotheke des Universitätsklinikums Gießen-Marburg (UKGM GmbH) bezogen.

3.1.3 Antikörper

Antigen (Klon)	Donor	Dilutionsbereich	Herkunft
Anti-Aktin (I-19)	Kaninchen	1:1.000-1:5.000	Santa Cruz
Anti-FGF-BP _t ²⁴	Kaninchen	1:500-1:1.000	Prof. Aigner
Anti-FGF-BP-Peptide (Immunogen: <i>KVVSEQKDTL</i>)	Kaninchen	1:1.000-1:2.500	Prof. Aigner
Anti-FGF-BP (196519)	Kaninchen	1:1.000-1:2.000	RnD
Anti-GST-HRP	Ziege	1:5.000–1:10.000	Amersham/GE
Anti <i>His</i> ₆ (BMG-His-1)	Maus	1:500-1:1.000	Roche
Anti HMG-Y (FL-95)	Kaninchen	1:200-1:1.000	Santa Cruz
Anti HMG-Y (N-19)	Ziege	1:200-1:1.000	Santa Cruz
Anti- <i>myc</i> (9B11)	Maus	1:5.000-1:10.000	Cell Signaling
Anti- <i>xpress</i> ®	Maus	1:5.000-1:10.000	Invitrogen
Anti-Maus IgG-HRP	Schaf	1:1.000-1:10.000	Amersham/GE
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Affe	1:1.000-1:10.000	Amersham/GE
Anti-Ziege IgG-HRP	Affe	1:1.000-1:10.000	Santa Cruz

24) Zur Immunisierung diente ein GST-Fusionsprotein von FGF-BP [129].

3.1.4 Oligonukleotide und Vektoren

Name (Hersteller)	Verwendung
pTrcHis (Invitrogen)	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor
pGEX-2TK (Invitrogen)	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine
pFASTBAC (Invitrogen)	Baculovirus-Expressionsvektor für Insektenzellen
pcDNA3.1neo/Hygro (Invitrogen)	Säugerzell-Expressionsvektor
pRcCMV (Invitrogen)	Säugerzell-Expressionsvektor
pPIC6 (Invitrogen)	<i>P. pastoris</i> -Expressionsvektor (intrazelluläre Proteinproduktion)
pPIC9K (Invitrogen)	<i>P. pastoris</i> -Expressionsvektor (sekretierte Proteinproduktion)
pSinglet-tTS (Clontech)	Säugerzell-Expressionsvektor für shRNAs

Die für PCR-Amplifikationen benötigten Oligonukleotide wurden von MWG (*Eurofins-Biotech*,) bezogen. Sequenzen sowie der jeweilige Verwendungszweck sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen (immer von 5' nach 3'). Abkürzungen (*se*) oder (*as*) zeigen an, ob der Primer *sense* oder *antisense* verwendet wurde. Für präparative sowie quantitative *real-time* PCR (*qRT-PCR*, siehe Abschnitt 3.2.1.10) wurden ausschließlich HPLC-gereinigte Oligonukleotide eingesetzt.

Klonierungen von FGF-BP für das *E. coli* Expressionsplasmid pTrcHis wurden durch Insertion mit *XhoI*- und *EcoRI*-verdauten PCR-Produkten durchgeführt. Um bei Verwendung dieser Restriktasen den korrekten Leserahmen beizubehalten musste die Version *C* verwendet werden. Der His₆-tag sowie das *xpress*[®]-Epitop sitzen N-terminal, das Stopcodon ist Bestandteil der PCR-Primer und führt zum Translationsabbruch unmittelbar hinter der entsprechenden cDNA-Sequenz.

Die Konstruktion der rekombinanten DNA von HMGA1 in pTrcHis wurde von Chen [243] durchgeführt und führt zur Expression der HMGA1a-Isoform (~11,7 kDa zzgl. tags, ~3,5 kDa). Das *E. coli* Protein erscheint im Immunblot als Doppelbande.

Klonierungen im *P. pastoris*-Expressionsplasmid pPIC9K erfolgten über *EcoRI* und *AvrII* (=XmaII)-Schnittstellen. Da dieser Vektor, bedingt durch *multi copy* Insertionen (Klone mit mehrfacher Vektorintegration ins Hefegenom, siehe Abschnitt 3.2.4.3.3), zwar eine hohe Proteinproduktionen ermöglicht, jedoch über keine weiteren Affinitäts- oder Epitope-tags verfügt, wurden die amplifizierten cDNAs zuvor in das Plasmid pPIC6C eingebracht (über *EcoRI*- und *XhoI*-Schnittstellen). Dadurch erhielten die rekombinanten DNAs zusätzlich C-terminal das *c-myc*-Epitop sowie einen His₆-tag. Alle Deletionsmutanten konnten unter Verwendung eines fixen *antisense*-Primers (His₆_Avr_II_as) und jeweils spezifischen *sense*-Primern in pPIC9K überführt werden.

Name	Sequenz (5' - 3')
<i>E. coli</i> BP_C34 („KVV_se“)	att ctcgag aaa gtg gtc tcagaa caa a
<i>E. coli</i> BP_C91 („EFS_se“)	att ctcgag gaa ttt tcc tgt gtc ttt gc
<i>E. coli</i> BP_C146 („SSL_se“)	att ctcgag tcc agt ctt aag cta gtc ag
<i>E. coli</i> BP_N99 („AGN_as“)	att gaattc tta att gcc agc aaa gac aca g
<i>E. coli</i> BP_N215 („FCG_as“)	att gaattc tta tcc aca gaa ctc cag ggc
<i>E. coli</i> BP_N234 („TSC_as“)	att gaattc tta gca tga cgt gtc ctg cac
<i>E. coli</i> HMGA_Bam_HI_se	tat agg atc cag atg agt gag tgc agc tc
<i>E. coli</i> HMGA_Hind_III_as	tat aaa gct tgc atg ggt cac tgc tcc
<i>P. pastoris</i> BP_C34 („KVV_se“)	gga att cat gaa agt ggt ctc aga aca aaa g
<i>P. pastoris</i> BP_C91 („EFS_se“)	gga att cat gga att ttc ctg tgt ctt tgc
<i>P. pastoris</i> BP_C146 („SSL_se“)	gga att cat gtc cag tct taa gct agt cag
<i>P. pastoris</i> BP_N99 („AGN_as“)	ccg ctc gag att gcc agc aaa gac aca g
<i>P. pastoris</i> BP_N215 („FCG_as“)	ccg ctc gag tcc aca gaa ctc cag ggc
<i>P. pastoris</i> BP_N234 („TSC_as“)	ccg ctc gag gca tga cgt gtc ctg
<i>P. pastoris</i> („His ₆ _Avr_II_as“)	tta cct agg tta atg atg atg atg atg gtc

spezielle Primersequenzen, die zur Konstruktion von Expressionsvektoren für humanes full length FGF-BP (nt. 197-799 der mRNA) sowie FGF-BP Deletionsmutanten eingesetzt wurden.

Die Sequenzen der verwendeten Standardprimer AOX, T3, T7, BGH, pGEX, pTrcHis können der Homepage www.eurofindna.com entnommen werden.

Name (NCBI RefSeq der mRNA)	Sequenz (5' - 3')	Länge des Amplikons/ T_M (melting peak), (d/dT)Fl_{530nm}
beta Actin_se (NM_001101.3)	ccaaccgcgagaagatga	97 nt. / ~85°C
beta Actin_as (NM_001101.3)	ccagaggcgtagaggatag	
FGFBP1_se (NM_005130.3)	actggatccgtgtgctcag	72 nt. / ~85°C
FGFBP1_as (NM_005130.3)	gagcagggtgaggctacaga	
GAPDH_se (NM_002046.3)	agccacatcgctcagacac	66 nt. / ~83°C
GAPDH_as (NM_002046.3)	gcccaatacgaccaaattcc	

Primer, die für Genexpressionsanalysen verwendet wurden (qRT-PCR). Die Ableitung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Roche Universal Probe Finder Software.

Name	Sequenz
EGFP siRNA (<i>siEGFP</i>)	5'- GCAGCACGACUUCUUCAAG tt - 3' 3'- tt CGUCGUGCUGAAGAAGUUC - 5'
FGF-BP siRNA no. 124644 (<i>siBP44</i>)	5'- GGUUGAGUGCACUCAAUUG tt - 3' 3'- tt CCAACUCACGUGAGUUAAC - 5'
FGF-BP siRNA no. 124645 (<i>siBP45</i>)	- unbekannt -
FGF-BP siRNA no. 124646 (<i>siBP46</i>)	5'- GCCAGAGUGAUAAUUUCAG tt - 3' 3'- ct CGGUCUCACUAUUAAGUC - 5'
Luciferase siRNA (<i>siLuc3</i>)	5'- CGUACGCGGAAUACUUCGA tt - 3' 3'- tt GCAUGCGCCUUAUGAAGCU - 5'

verwendete siRNAs (Bezug als annealte Duplexe über Ambion).

FGF-BP shRNA "A" (mRNA 253-271)

5'- tcgag g CACCCAGATTAAGCAGAAA ttcaagaga tttctgettaatctgggtg c tttttt a -3'
 3'- c c GTGGGTCTAATTCGTCTTT aagttctct aaagacgaattagaccac g aaaaaa ttcga -5'

FGF-BP shRNA "B" (mRNA 490-508)

5'- tcgag g AGACATCTGTAGATATTCC ttcaagaga ggaatatctacagatgtct c tttttt a -3'
 3'- c c TCTGTAGACATCTATAAGG aagttctct ccttatagatgtctacaga g aaaaaa ttcga -5'

FGF-BP shRNA "C" (mRNA 364-382)

5'- tcgag g GGTTGAGTGCACTCAATTG ttcaagaga caattgagtgactcaacc c tttttt a -3'
 3'- c c CCAACTCACGTGAGTTAAC aagttctct gtaactcacgtgagttgg g aaaaaa ttcga -5'

Firefly Luciferase shRNA (humanisiert, pGL3)

5'- tcgag g TGCGCTGCTGGTGCCAAC ttcaagaga gttggcaccagcagcgca c tttttt a -3'
 3'- c c ACGCGACGACCACGGTTG aagttctct caaccgtggtcgtcgcgt g aaaaaa ttcga -5'

Firefly Luciferase shRNA (wildtyp, pGL2)

5'- tcgag g TGCGCTGCTGGTGCCAAC ttcaagaga gttggcaccagcagcgca c tttttt a -3'
 3'- c c ACGCGACGACCACGGTTG aagttctct caaccgtggtcgtcgcgt g aaaaaa ttcga -5'

SingTetU6_se	atatgcttaccgtaacttg
SingTetU6_as	aacggtctgggttataggta
Sing_Seq	gaagcggaagagcgcccaatacgcaaacgcct

spezielle Oligonukleotide für den shRNA-Expressionsvektor pSingle-tTs.

SingTetU6-Primer wurden bei der Colony-PCR (siehe Abschnitt 3.2.1.7) verwendet, um die Klonierung der shRNAs in pSinglet-tTS resp. die Integration des Vektors in das Genom der Zielzellen zu überprüfen (siehe Abschnitt 3.2.1.8). Der o.g. Sing_Seq Primer wurde der DNA-Sequenzierung beigefügt, um den korrekten Einbau der shRNA-Oligonukleotide zu bestätigen (spezielle Sequenzierung für *hairpins* notwendig). Die Klonierung der shRNAs ist in Abschnitt 3.2.6.9 beschrieben.

3.1.5 Standardlösungen, Puffer und Antibiotika

Standardlösungen und Puffer wurden gemäß den Vorgaben klassischer molekularbiologischer Protokolle angefertigt (siehe Sambrock *et al.* [244]). Puffer und Lösungen spezieller Zusammensetzung können im entsprechenden Methodenteil unter Angabe des jeweiligen Einsatzzwecks gefunden werden. Verwendete Antibiotika sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen. Es wurden ausschließlich tiefgefrorene Aliquots bzw. frisch hergestellte Selektionslösungen eingesetzt.

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Verwendungszweck
Ampicillin	100µg/ml	Selektionsmarker aller verwendeten Klonierungsvektoren (außer für pPIC6)
Blasticidin	100µg/ml	Selektionsmarker von pPIC6
G418 (Geneticin [®])	500µg/ml-1000µg/ml	Selektionsmarker stabil transfizierter Säugerzellen
	0,5 mg/ml-5mg/ml	Auffindung von Vektor-Mehrfachinsertionen in <i>P. pastoris</i>
Hygromycin	200-400µg/ml	Selektionsmarker doppelt stabil-transfizierter Säugerzellen
Normocin [®]	100µg/ml	Mykoplasmenprophylaxe in der Zellkultur (Kombination mehrerer Antibiotika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen)

3.1.6 Gewebekulturmedien und Seren

Kulturmedien für die Zellkultur sowie PBS (Dulbecco's PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) und Trypsin-EDTA (UV-irradiated) wurden von der Fa. PAA (Cölbe, Deutschland) bezogen. Es kamen verschiedene Seren (FCS, fetales Kälber-Serum) zur Verwendung. Falls nicht anders angegeben, wurde FCS von Gibco (*EU approved*) eingesetzt. Beim Screenen von Klonen des Dox-induzierbaren shRNA-Expressionssystems (siehe Abschnitt 3.2.6.9) wurden die Zellen ggf. in *Tet approved*-FCS (Clontech) kultiviert.

3.1.7 Zelllinien und Wirtsstämme (Bakterien/Hefen)

<i>E. coli</i>-Stämme	Spezifikation
DH5 α (GE Healthcare)	Stamm zum Propagieren von DNA
BL-21-T1 ^R (Sigma)	proteasedefizienter Expressionsstamm

<i>Pichia</i>-Stamm	Spezifikation
GS115 (Invitrogen)	Hefe-Expressionsstamm

Zelllinie (Bezugsquelle)	Herkunft	Spezifikation
SF-9 (ATCC)	Insekten	immortalisierte Ovar-Zellen aus <i>Spodoptera frugiperda</i> [245]
COS-7 (ATCC)	simian	Affennierenzellen aus <i>Cercopithecus aethiops</i> (Grünmeerkatze) [246]
ME-180 (ATCC)	human	epidermoidales Zervixkarzinom [247]
LS174T (ATCC)	human	Kolon-Adenokarzinom [248]
SW-13 (ATCC)	human	Nebennierenkarzinom (Adenokarzinom des adrenalen Cortex) [249]
PC-3 (ATCC)	human	Prostata-Adenokarzinom [250]
SKOV3-10 (AG Aigner)	human	ovarielles Adenokarzinom [199, 251] (stabil <i>Luciferase-exprimierender Klon</i>)

3.1.8 Versuchstiere

Athymische Nacktmäuse (Crl:CD1-Foxn1 *nu/nu*) wurden von Charles River Lab. bezogen. Die Tiere wurden ab einem Alter von ~8 Wochen für Experimente verwendet. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter keimreduzierten Bedingungen und gemäß Tierhaltungsverordnung nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Giessen/Lahn.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von DNA

Spaltungen von DNA mit spezifischen Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen in den beigegeführten Puffersystemen durchgeführt. Für einen Kontrollverdau bzw. einen Klonierungsansatz wurden standardmäßig 1 µg DNA mit 2-5 Einheiten der Endonuklease(n) versetzt und anschließend per Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.1.2) aufgetrennt. Verknüpfungen von DNA-Fragmenten erfolgten unter Einsatz der T4-Ligase. Dabei wurde für eine Ligation von überhängenden Enden ein 3- bis 10-facher molarer Überschuß eines gereinigten DNA-Inserts mit 50ng linearisiertem Vektor versetzt und bei 16°C ü.N. inkubiert. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wurde dieser zuvor für 1 h bei 37°C durch eine Behandlung mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) dephosphoryliert. Die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10 min beendete die Hydrolysereaktion der endständigen Phosphatgruppen. Der Ansatz konnte direkt für eine Ligation weiterverwendet werden.

3.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA zu analytischen bzw. präparativen Zwecken erfolgte in Gelen mit einer Agarosekonzentration von 0,6 bis 2,0% (w/v) in TAE-Puffer (40mM Tris, 20mM Essigsäure, 2mM EDTA, pH 8,3, Agarose NEEO Ultra, Roth). Zur Sichtbarmachung der DNA auf einem Transilluminator wurde dem Gel 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Präparative Gele von PCR-Produkten (siehe Abschnitt 3.2.1.8) sowie Aufarbeitungen von Restriktionsfragmenten erfolgten durch Ausschneiden der gewünschten Bande und Reinigung mit Hilfe des *High-Pure PCR Product Purification Kits* (Roche).

3.2.1.3 Aufreinigung von genomischer DNA

Zur Extraktion von genomischer DNA (gDNA) aus Zellen wurde das *High-Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche) verwendet. Die Aufreinigung aus kultivierten Zellen war im 12-Well oder 6-Well-Format möglich. So erhaltene DNA konnte direkt für PCR-Experimente (siehe Abschnitt 3.2.1.8) eingesetzt werden. Für die präparative Isolierung von gDNA aus humanen Zellen wurde eine Vorschrift mit Proteinase K und Phenol verwendet (adaptiert nach [244]). Dazu wurden LS174T-Zellen bis zu einer Konfluenz von ~80% in T75-Flaschen adhärent kultiviert, in PBS gewaschen und nach Trypsinbehandlung in Lysepuffer (100mM EDTA, 0,1% SDS (w/v), 10mM Tris pH 8) aufgenommen. Im Anschluß an eine kurze Vorbehandlung mit RNase A (20 µg/ml) wurde die Kernmembran für 1 h bei 37°C mit Proteinase K (100 µg/ml) verdaut. Nach Zentrifugation des Zellaufschlusses (13.000 rpm für

10 min) erfolgte eine Phenol-Chloroform Reinigung des Lysats. Die DNA wurde in 80% EtOH sowie 2M NH_4OAc -Lösung präzipitiert, anschließend zweimal mit 70% EtOH gewaschen, und in Nuklease-freiem Wasser gelöst. ($c \approx 0,5 \text{ mg/ml}$).

3.2.1.4 Aufreinigung von Plasmiden (Mini- und Großpräparation)

Plasmid-DNA aus Bakterien-Übernachtskulturen wurde unter Verwendung von *peqGold Miniprep-Kit II* (PeqLab) sowie *NucleoBond® Xtra Midi Kit* (Macherey-Nagel) nach Angaben der Hersteller im Mini- oder Midimaßstab isoliert. Es kamen ausschließlich die in den genannten Kits vorhandenen Puffer zur Verwendung. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C . Für Zellkulturexperimente wurde eine Sterilfiltration der DNA mit Spin-X Filterröhren ($0,22 \mu\text{m}$, Corning) durchgeführt.

3.2.1.5 RNA-Präparation aus Gewebe und Zellkultur

Das Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA mit TRI-Reagenz (Sigma) basierte auf der Guanidin-isothiocyanat/Phenolextraktionsmethode [252]. Zur Gewinnung von RNA aus Tumoren wurde das entsprechende Gewebe (ca. 100mg Tumor) in ein RNase-freies 2ml Reaktionsgefäß überführt, mit Hilfe eines Ultra Turrax (Janke&Kunkel) elektrisch homogenisiert und anschließend in 1ml TRI-Reagenz aufgenommen. Die Aufarbeitung von RNA aus adhärennten Zellen erfolgte durch Absaugen des Mediums und direkte Aufnahme des Monolayers in 1ml TRI-Reagenz je 6-Well. Nur maximal ~90% konfluente Zellen wurden verwendet. Die weiteren Schritte der Reinigung wurden gemäß Hersteller-vorschrift durchgeführt und führten zu einer selektiven Abreicherung von DNA sowie Proteinen. Durch den Zusatz von $200 \mu\text{l}$ Chloroform je eingesetztem ml TRI-Reagenz bildeten sich nach Zentrifugieren drei Phasen aus. Die RNA wurde aus der oberen wäßrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropylalkohol präzipitiert. Im Anschluß erfolgten zwei Waschschrte mit 70% Ethanol. Das Lösen der getrockneten RNA erfolgte durch Erwärmen des Pellets für 5 min bei 65°C . Alle Arbeiten wurden in RNase-freier Umgebung durchgeführt (Behandlung der Arbeitsflächen und Gerätschaften mit 0,5% SDS-Lösung (w/v), ausschließliche Verwendung von Nuklease-freiem Wasser sowie frischen Reaktionsgefäßen).

3.2.1.6 Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mittels Absorptions-spektrometrie gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz. Die Messung wurde bei 280nm in einem Spektralphotometer (Nanodrop 1000, Peqlab) durchgeführt. Zum Nullabgleich diente das gleiche Wasser, in welchem die Proben gelöst waren. Die Reinheit der Nukleinsäuren ergab sich aus der Bestimmung des Koeffizienten aus A_{260} und A_{280} (positiv $A_{260}/A_{280}=1,8 - 2,0$).

3.2.1.7 Colony-PCR (Screening nach rekombinanten Klonen)

Eine Colony-PCR wurde durchgeführt, um den Erfolg einer Transformation (siehe Abschnitt 3.2.4.1.2) zu kontrollieren bzw. um zu überprüfen, ob eine Ligationsreaktion zum Einbau eines Inserts in den Zielvektor führte. Mit dieser Methode konnten so gleichzeitig viele Klone überprüft werden, ohne dazu vorher die DNA isolieren zu müssen. Das Verfahren funktionierte in *E. coli* zum Nachweis episomaler Plasmide ebenso wie bei stabil ins Genom integrierten Vektoren bei *P. pastoris* [253]. Zur Durchführung wurde direkt von der Transformationsplatte eine kleine Menge der zu prüfenden Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze in ein PCR-Reaktionsgefäß eingebracht und gemäß Abschnitt 3.2.1.8 analysiert. Der initiale Denaturierungsschritt einer PCR war dabei ausreichend, um einen Zellaufschluß herbeizuführen und die nachzuweisende DNA in den Reaktionsansatz zu überführen. Unter Verwendung von allgemeinen Primern des Vektorrückgrats *upstream* und *downstream* der Klonierungsstellen konnte eindeutig unterschieden werden zwischen dem Leervektor (lediglich Amplifikation der MCS), Vektor mit Insert (Amplifikation der MCS plus Insert), und einer „Hintergrunds“-Kolonie (falls kein PCR-Produkt entstanden ist).

3.2.1.8 Amplifikation von RNA (RT-PCR) und PCR aus gDNA

Amplifikationen von cDNA wurden durchgeführt, um die Expression bestimmter Gene zu untersuchen (qualitativer Nachweis von mRNAs, sog. *two-step* RT-PCR). Zunächst wurde die reverse Transkription der RNA durchgeführt. Die Erststrangsynthese erfolgte nach Vorgaben des Herstellers (*RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase*, Fermentas) mit 1 µg RNA und *random hexamer*-Primern, so dass die gesamte RNA der Probe in cDNA umgeschrieben wurde. Inkubationszeiten der einzelnen Reaktionsschritte sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen. Die erhaltene cDNA konnte direkt für eine nachfolgende PCR weiterverwendet werden. cDNAs für *qRT-PCR*-Analysen (siehe Abschnitt 3.2.1.9) wurden mindestens um den Faktor 10 mit Nuklease-freiem Wasser (Fermentas) verdünnt.

PCR-Phase	Temperatur	Zeit
Annealing	65°C	5 min
Präinkubation	25°C	10 min
reverse Transkription	42°C	60 min
Hitzeinaktivierung der RT	70°C	10 min

Ablauf der reversen Transkription (Erststrangsynthese).

Genomische DNA (gDNA) wurde als Matrize eingesetzt, um den Erfolg einer stabilen Transfektion (Integration der rekombinanten DNA ins Genom) zu überprüfen. Dies war insbesondere bei klonalen Selektionierungen zum Nachweis der shRNA-Expressionskassette notwendig, da nicht alle G418-resistente Kolonien sämtliche Bestandteile des Zielvektors stabil ins Genom eingebaut hatten. Unter Verwendung von vektorspezifischen Primern konnte die gewünschte Sequenz amplifiziert werden. Zeigte die PCR unter den nachfolgend angegebenen Standardbedingungen nicht das gewünschte Ergebnis, wurde die Reaktion durch Variieren einzelner Parameter (z.B. der Mg^{2+} -Konzentration, Annealingtemperatur oder Zykluszahl) optimiert. Die Verwendung von gDNA als komplexes *Template* erforderte gegebenenfalls eine nachgeschaltete zweite PCR, wobei ein Aliquot aus der ersten Amplifikation als Matrize für eine nachfolgende Reaktion diente, um das erwünschte Produkt zu erhalten („*nested*“ PCR).

Komponente	Menge
<i>template</i> -DNA	~10-50ng Plasmid-DNA ~100-500ng gDNA ~2µl cDNA (aus 3.2.1.8)
<i>sense/antisense</i> -Primer (10µM)	je 1,5µl
10x <i>Taq</i> Puffer	2,5µl
MgCl ₂ (50mM)	2µl
dNTP-Mix (jeweils 10mM)	0,8µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,3µl
ddH ₂ O	ad 25µl

Standard-PCR-Protokoll mit Taq-Polymerase (für analytische Zwecke).

PCR-Phase	Temperatur	Zeit	
Präinkubation	94°C	5 min	
Denaturieren	94°C	30 sec	~25-35 PCR- Zyklen
Annealing (primerspezifisch, T_M -abhängig)	47°C-55°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 sec je 20 nt. Amplikonlänge	
terminale Elongation	72°C	7 min	

Temperatur-Zeit-Verlauf einer Standard-PCR.

3.2.1.9 Präparative PCR

Da bei Klonierungen die Amplifikation der gewünschten *template*-DNA möglichst fehlerfrei erfolgen sollte, kamen ausschließlich *proofreading*-Polymerasen (*Pwo*-Polymerase, Fermentas) mit Korrekturaktivität zur Verwendung. Dabei wurde die Zykluszahl gering gehalten, um die Rate an PCR-induzierten Mutationen zu minimieren (~25 Zyklen). PCR-Produkte wurden mit Hilfe des *High-Pure PCR-Product Purification Kits* (Roche) gemäß Herstellervorschrift aufgereinigt.

3.2.1.10 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Real-time PCR ist dem heutigen Stand der Technik entsprechend eine der zuverlässigsten und sensitivsten Methoden, um die Expression von Genen zu untersuchen. Für die Quantifizierung von Zielnukleinsäuren wurde die SYBR Green-Methode durchgeführt (*two-step qRT-PCR*). Der Reaktion liegt zugrunde, dass sich der Farbstoff SYBR Green (unspezifisch) in doppelsträngige Nukleinsäuren einlagert. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal ist proportional zur Menge an amplifizierter DNA. Um die Bildung von unspezifischen PCR-Produkten sowie Primer-Dimeren auszuschließen, wurde im Anschluß an die Reaktion stets eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Ableitung genspezifischer Primer erfolgte mit Hilfe der *Universal Probe-Finder* Software (Roche-Applied-Sciences), welche zum Auffinden von Transkript-spezifischen Sequenzen einen *Intron-spanning Assay* durchführt²⁵. Als interner Standard wurden die Haushaltsgene β -Aktin sowie GAPDH verwendet (endogene Referenzgene). Eine Normierung der Genexpression erfolgte durch relative Quantifizierung mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode [254, 255]. Dabei wurde, nach vorhergehender Ermittlung eines linearen Zusammenhangs zwischen cDNA-Verdünnung und dem C_T -Wert der amplifizierten Genprodukte, eine idealisierte PCR-Effizienzrate von 2,0 Verdoppelungen pro Zyklus angenommen. Die Messung erfolgte in Duplikaten je Primerpaar in einem *Light Cycler* (Roche) mit 10 μ l Reaktionsansatz pro Kapillare, bestehend aus 4 μ l cDNA-Verdünnung (Dil. 1:20-1:50), 1 μ l Primerpaar (*sense* und *antisense* Primer, jeweils 5 μ M) und 5 μ l QuantiTect SYBR Green 2x Master-Mix (Thermo Scientific). Das PCR-Standardprogramm (15-minütige Hitzeaktivierung der *Taq*-Polymerase (95°C), 55 Zyklen zu je 10 sec. Denaturieren (95°C), Annealing (54°C), Elongation (72°C)) funktionierte bei allen cDNAs resp. Primerpaaren reproduzierbar.

25) Beim Primer-Design sollte mindestens ein Intron flankiert werden, um ausschließlich prozessierte Transkripte zu amplifizieren. Verunreinigungen mit genomischer DNA können bei RNA-Präparationen häufig auftreten und stören die PCR. Ggf. muss daher vor der PCR ein DNase-Verdau durchgeführt werden.

3.2.1.11 Herstellung radioaktiver Sonden und Southern blotting

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Nukleinsäuren auf Nylonmembranen (Hybond N, Amersham) wurde mittels Kapillarblot ü.N. durchgeführt (20xSSC als Transferpuffer). Vor der Hybridisierung wurde die Membran für 2h bei 80°C gebacken und für weitere 2h bei 42°C in Prähybridisierungslösung abgesättigt.

Radioaktive Markierungen von Nukleinsäuren wurden entsprechend ihrer Länge entweder über Nick-Translation (*Rediprime II Random Prime Labelling System*, GE) oder über ein 5'-Endlabeling mittels Polynukleotidkinase (T4-PNK, Fermentas) durchgeführt. Für den Einbau radioaktiven Phosphors wurden 25ng *template*-DNA (z.B. PCR-Produkt) und 5µl (=50µCi) α-[³²P]dCTP (Amersham *Redivue*, GE) gemäß Herstellervorschrift in das *Labeling Kit* überführt und 30 min bei 37°C inkubiert (Reaktion mit Hilfe des Klenow-Fragments). Die 5'-Endmarkierung mittels PNK erfolgte mit 5µl (=50µCi) γ-[³²P]dCTP und 50pmol Oligonukleotiden. Nicht-inkorporierte Nukleotide wurden durch Gelfiltration (*Micro Bio-Spin Chromatography Columns*, Bio Rad) entfernt. Die gereinigte Sonde wurde nach einem Denaturierungsschritt (5 min bei 95°C) direkt der Prähybridisierungslösung zugesetzt und bei 42°C im Hybridisierofen mit der Probe ü.N. inkubiert. Je nach erforderlicher Stringenz wurde mit SSC-Lösung gewaschen (2x oder 0,1x). Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C in einer Expositionskassette (*Hypercassette*, GE) mit Verstärkerfolie durch Auflegen eines Röntgenfilms (BioMax, Kodak) bis zum Erscheinen der gewünschten Signale (wenige Minuten bis mehrere Tage).

Puffer	Zusammensetzung	
20x SSC (<i>Saline with Sodium Citrat</i>)	3M NaCl 300mM Na ₃ -citrat x 2H ₂ O ddH ₂ O pH 7,0	
50x Denhard's	2% Ficoll 40 2% Polyvinylpyrrolidon (PVP) 2% BSA (Fraktion V)	
Prähybridisierungslösung (je Membran ~10ml)	2,5ml 20x SSC 1 ml 50x Denhard's 0,5ml 10% SDS (w/v) 6 ml ddH ₂ O	<i>unmittelbar vor Verwendung 100µl hitze-denaturierte Lachs-sperma-DNA zugeben.</i>

Zusammensetzung der Puffer beim Southern blotting.

3.2.1.12 DNA Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger [256] von der MWG Biotech AG (Ebersberg) durchgeführt und mittels EditSeq[®]-Software (DNASTAR INC.) auf Korrektheit überprüft.

3.2.2 Statistische Methoden

Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe von SigmaPlot. Beim t-Test wurden Werte von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3.2.3 Software und Internet-Ressourcen

Die vorliegende Arbeit wurde mit Hilfe der nachfolgend aufgeführten Computerprogramme sowie internetbasierten Hilfsmodulen angefertigt.

Programm	Quelle	Verwendung
ATCC	www.atcc.org <i>American Type Culture Collection</i>	-Anbieter/ Informationsplattform für die Zellkultur
BLAST	NCBI (National Center for Biotechnology Information) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	-Analyse biologischer Sequenzdaten -Auffinden von Homologien
Cell Quest Pro	BD Biosciences	-Bearbeiten von FACS-Analysen
Clontech shRNA Sequence Designer	www.clontech.com	-shRNA Suchalgorithmus nach Tuschl <i>et al.</i> [206] sowie Reynolds <i>et al.</i> [232]
DNA-Star EditSeq PrimerSelect	DNASTAR INC.	-DNA-/Proteinsequenzanalysen -Ableiten von PCR-Primern -Auffinden von Schnittstellen
GCUA	www.gcuu.schoedl.de	-Erstellen von graphischen <i>codon usage tables</i> zur Auffindung seltener Codons
ImageJ	NIH (National Institutes of Health)	-Analytisches Grafikprogramm
Kazusa	www.kazusa.or.jp/codon	-Übersicht über die <i>codon usage</i> verschiedener Organismen
MWG Eurofins siRNA Designer	www.ecom.mwgdna.com	-siRNA Suchalgorithmus
Roche Universal Probe Finder	www.roche-applied-science.com	-Ableitung von Primern für qRT-PCR
SigmaBlot 10.0	Systat Software Inc.	-Erstellen von Statistiken und Graphen -Ermittlung von IC_{50} -Werten
siRNA-Design-Software (SDS)	University of Hong Kong www.i.cs.hku.hk/~sirna/software/sirna.php	-Metasuchmaschine für siRNAs (vereint viele Algorithmen)

3.2.4 Rekombinante Expression und Reinigung von Proteinen

3.2.4.1 Arbeiten mit *E. coli*

3.2.4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zum Propagieren von Plasmid-DNA erfolgte nach der Vorschrift von Inoue [257]. Dazu wurde eine Kolonie von DH5 α -Zellen von einer LB-Agarplatte in SOC-Medium (0.5% Hefe-Extrakt, 2% Trypton, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM Glucose, steril) überführt und bei 16°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Nach raschem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen bei 800g pelletiert und in eiskaltem Transformationspuffer (TB: 10mM PIPES, 15mM CaCl₂, 250mM KCl, pH 6,7 mit KOH, dann Zusatz von 55mM MnCl₂) resuspendiert. Nach langsamen Zusetzen des Kryoprotektivums DMSO (Endkonzentration 7% (v/v)) konnten die Aliquots in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert werden. Kompetente BL-21 für die rekombinante Expressionen von Proteinen wurde von Sigma bezogen.

3.2.4.1.2 Transformation von *E. coli*

Zur DNA-Transformation in *E. coli* wurde ein Aliquot chemokompetenter Bakterien (siehe Abschnitt 3.2.4.1.1) langsam auf Eis aufgetaut, mit 50ng Plasmid-DNA bzw. 1 μ l einer Ligationsreaktion versetzt und für weitere 15 min auf Eis gehalten. Anschließend wurde der Ansatz für 30-60 sec bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden unterschiedliche Mengen auf frischen Selektionsplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C bis zum Erscheinen von Kolonien bebrütet. Zur Kontrolle diente ein Aliquot von Bakterien ohne den DNA-Zusatz. Bei Ligationen wurde zusätzlich ein Ligase-freier resp. Phosphatase-freier Ansatz transformiert, um auf einen unvollständigen Plasmid-verdau sowie Religanten zu testen.

3.2.4.1.3 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in autoklaviertem LB-Medium (0,5% Hefe-Extrakt (w/v), 1% Trypton (w/v), 1% NaCl (w/v), in ddH₂O pH 7,4) unter Zusatz des entsprechenden Selektionsantibiotikums (100 μ g/ml Ampicillin bzw. Blastidicin)²⁶. Die Kolben wurden auf einem Schüttelinkubator bei ~220-250rpm unter Beachtung einer ausreichenden Belüftung inkubiert. Die Langzeitlagerung von Bakterien erfolgte bei -80°C in Kryostocks, bestehend aus 0,6 ml einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur und 0,4 ml Glycerol.

26) Beim Einsatz von Blastidicin musste Niedrigsalz LB-Medium verwendet werden (nur 5g NaCl/l).

3.2.4.1.4 Anlegen von *E. coli*-Expressionskulturen

Zur Gewinnung von rekombinanten FGF-BP und HMGA1 aus *E. coli* wurde ein unter Kontrolle des *trc(trp-lac)*-Promotor induzierbares Expressionssystem eingesetzt [258]. Die verwendeten Plasmide codierten für den *lac* Repressor (konstitutive Expression des *lac^q*-Gens). Erst durch Zugabe des stabilen Zuckeranalogons IPTG erfolgte die Induktion der Proteinexpression über Derepression des Promotors. Als Wirtsorganismus diente der proteasedefiziente Stamm BL-21 (Sigma). Zum Anhäufen einer größeren Menge an Biomasse wurden ~3 - 10 positive Einzelkolonien von einer frischen Transformationsplatte in 250 ml LB-Medium überführt, mit 0,2% (w/v) einer sterilen Glucose-Lösung versetzt (Repression des Promotors) und ü.N. vorkultiviert. Am Folgetag wurden die Bakterien in Expressionskolben mit frischem LB-Medium überführt, auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 gebracht und für weitere 60 min bei 37°C inkubiert, bevor die IPTG-Zugabe erfolgte. Zur Ermittlung der optimalen Produktionsbedingungen, wurden die Parameter Expressionsdauer (3-18h), IPTG-Konzentration (0,1mM - 5mM) und Inkubortemperatur (18°C, 25°C, 37°C) variiert. Um die IPTG-Induzierbarkeit zu erhalten, wurden Expressionskulturen stets frisch transformiert.

3.2.4.2 Arbeiten mit Sf-9 Insektenzellen

3.2.4.2.1 Kultivierung und Lagerung von Sf-9

Alle Schritte der Handhabung von Insektenzellen erfolgten analog zu den Methoden in der Zellkultur (siehe Abschnitt 3.2.6.1). Sf-9 Zellen wurden in Insektenmedium (*Sf-900 SFM-II*, Invitrogen) unter Zusatz von 10% FCS in einem 27°C-Inkubator ohne CO₂-Zusatz bis zu einer 100%igen Konfluenz adhärent kultiviert (im überkonfluenten Stadium wuchsen die Zellen in Suspension weiter). Das Passagieren erfolgte durch mechanisches Abschlagen der Zellen und Überführen in neue Kulturflaschen. Da im Kulturmedium kein Farbindikator enthalten war, wurde nach spätestens 5 Tagen routinemäßig ein Mediumswechsel durchgeführt. Zur Langzeitlagerung diente ein Einfriermedium bestehend aus 60% Kulturmedium, 30% FCS und 10% DMSO (sterilfiltriert).

3.2.4.2.2 Rekombinante Expression und Infektion mit Baculoviren

Zur Gewinnung von rekombinantem FGF-BP aus Insektenzellen wurde das *BAC-TO-BAC* Baculovirus-System (Invitrogen) verwendet. Das Expressionsplasmid lag als replikationskompetente virale Bacmid-DNA in Sf-9-Zellen stabil integriert vor. Die Infektion wurde durch Zugabe eines konditionierten Überstands bereits infizierter Insektenzellen zu exponentiell wachsenden Wildtyp-Zellen herbeigeführt (Verhältnis frisches Kulturmedium zu konditioniertem Überstand ~3:1 - 5:1). Der optimale Zeitpunkt für eine Infektion bzw. Ernte der Zellen wurde visuell ermittelt. Der Grad eines erfolgten Virusbefalls war mikroskopisch an der granulierten Struktur der Zellen erkennbar. Ausgereifte

Viruspartikel waren in eine protektive Hülle eingekapselt. Diese als Polyeder bezeichneten Okklusionskörper ließen befallene Zellen deutlich größer erscheinen als nicht befallene. In Abhängigkeit vom viralen Titer erfolgte die Ernte der FGF-BP exprimierenden Zellen ca. 4-8 Tage nach der Infektion. Maßgebend für den Erntezeitpunkt war die einheitliche Größe der infizierten Zellen. Als Kontrolle dienten nicht-befallene *wt*-Zellen. Der infektiöse Überstand war für eine Reinfektion bei 4°C für 4 Wochen lagerbar, eine Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C. Das Zellsediment wurde nach Abschnitt 3.2.4.5 weiterverarbeitet.

3.2.4.3 Arbeiten mit *Pichia pastoris*

3.2.4.3.1 Handhabung und Kultivierung von *Pichia pastoris*

Alle Schritte zur Handhabung von *P. pastoris* erfolgten nach Empfehlungen des Herstellers, so wie im *Pichia Expression-Kit Manual* beschrieben (Invitrogen). Es kamen ausschließlich autoklavierte Erlenmeyerkolben mit Schikanen und sterile Lösungen zum Einsatz. Die Kultivierung erfolgte bei 28°C, bei Suspensionskulturen unter Schütteln bei 180-220 rpm. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien (MM, BMM, YPD, BMGY, RDB) wurde hinsichtlich der Pufferung bei verschiedenen pH-Werten, Methanolkonzentration sowie den Zusatz von Stickstoffquellen und Proteaseinhibitoren variiert. Kryostocks zur Langzeitlagerung von Klonen wurden mit einer exponentiell wachsenden Kultur durch Zusatz von 40% Glycerin (v/v) zu einem komplexen Medium (BMGY oder YPD) hergestellt.

3.2.4.3.2 Transformation und Integration rekombinanter DNA in das *Pichia*-Genom

Die Integration rekombinanter DNA ins Genom von *Pichia* kann unter Komplementation (genetische Ergänzung), Zerstörung wirtseigener Erbfaktoren, oder dem Ersetzen nativer Gene erfolgen. Durch eine Linearisierung des Vektors vor der Transformation wird, bedingt durch Homologien der Plasmidsequenz zum Hefegenom, der Einbau des Plasmids an definierten Stellen erzwungen. Dieser Rekombinationsvorgang kann zur Änderung des Phänotyps von *Pichia* führen und wird bei der heterologen Proteinproduktion gezielt ausgenutzt. Dabei spielt insbesondere der Alkoholoxidase(AOX)-locus eine besondere Rolle, da die rekombinante Expression des Fremdproteins zum einen unter Kontrolle des AOX-Promotors steht, andererseits *Pichia* seinen Stoffwechsel komplett auf eine AOX-abhängige Alkoholverwertung umstellen kann, sobald Methanol als einzige Kohlenstoffquelle angeboten wird. Damit bietet dieses Expressionssystem den Vorteil, im nicht-induzierten Zustand große Mengen an Biomasse aufbauen zu können, die Proteinexpression erfolgt erst durch Methanolzugabe in einem nahezu proteinfreien Minimalmedium (MM).

Die für die Transformation notwendigen Linearisierungen konnten *nicht* mit den vom Hersteller empfohlenen Restriktasen *Sall*, *SacI* oder *NotI* durchgeführt werden, da die Erkennungssequenzen dieser Enzyme ebenfalls Bestandteil der FGF-BP-Sequenz bzw. der anklonierten *tags* waren und damit der Verdau zur Zerstörung der rekombinanten Plasmide geführt hätte. Nach Restriktionsanalysen wurden die Plasmide mit *XcmI* und *AatII* linearisiert, um die Rekombination in den AOX-Locus zu veranlassen. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock (modifiziert nach [259]). Dazu wurden GS115*wt* durch 100mM Lithiumchlorid(LiCl)-Lösung kompetent gemacht und sofort weiterverarbeitet. Jedem 50µl Aliquot eines Transformationsansatzes wurden nacheinander 240µl einer sterilen 50%igen PEG-3350 Lösung (w/v), 36µl 1M LiCl, 25µl fragmentierte, hitzedenaturierte Heringssperma-DNA (2 mg/ml) als *Carrier* sowie 5µg eines gereinigten, linearisierten Plasmids zugesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30°C erfolgte der Hitzeschock für 20 min bei 42°C. Da die Primärselektionierung transformierter Zellen über den dominanten Marker Histidindehydrogenase erfolgt (*His4*-Gen als Bestandteil des Vektors), wurde der Ansatz auf histidinfreien Agarplatten (RDB) bis zum Erscheinen der Kolonien kultiviert. Durch die Transformation in den AOX-Locus änderte sich der Phänotyp der Hefen bezüglich der Alkoholverwertung. Man erhielt zwei Hefepopulationen mit unterschiedlich schnellen Wachstumscharakteristika. Die ersten „schnell“-metabolisierenden Klone (*Mut*⁺) erschienen nach ~3 Tagen, die „Langsam-Metabolisierer“ (*Mut*^s) erst nach ca. 1 Woche. *His*⁺-Transformanten beider Phänotypen wurden hinsichtlich Proteinexpression überprüft. Der Erfolg der Transformation wurde zusätzlich durch eine Colony-PCR überprüft (siehe Abschnitt 3.2.1.7).

3.2.4.3.3 Selektionierung nach mehrfachen Vektorinsertionen

Die spontane Mehrfachinsertion eines Vektors ins Genom von *Pichia* führt meist auch zu einer vermehrten Proteinproduktion. Die Häufigkeit eines solchen Ereignisses beträgt ca. 1 - 10% und war im verwendeten Expressionsplasmid pPIC9K ermittelbar durch das Selektionsantibiotikum G418. In Abhängigkeit von der integrierten Kopienzahl exprimierten einzelne *multi-copy*-Klone das *neo*-Gen unterschiedlich stark, was zu einer dosisabhängigen Resistenz gegenüber dem Aminoglykosid führte [260]. Durch Verwendung von Agarplatten mit aufsteigenden G418-Konzentrationen wurde diese Korrelation ausgenutzt, um hoch-produzierende Klone zu selektionieren. Der Hersteller gibt einen ungefähr linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl integrierter Expressionskassetten und der dadurch bedingten Resistenz an. So vermittelt ein exprimiertes *neo*-Gen eine Toleranz über ~0,25 mg/ml G418. Klone, die bei ~4 mg/ml G418 noch wachsen, verfügen über 7 - 12 eingebaute Plasmidkopien. In der vorliegenden Arbeit wurden Transformanten gefunden, die diesen Gen-Dosiseffekt bis zu einer Konzentration von 5mg/ml G418 aufwiesen. Die Selektionierung erfolgte auf nährstoffreichem YPD-Agar. Nach G418-Zusatz waren diese Platten für ~4 Wochen bei 4°C lagerbar.

3.2.4.3.4 Anlegen von Expressionskulturen

Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Überführen einer reprimierten Vorkultur in BMGY-Medium in ein methanolhaltiges Minimal-Medium (MM/ BMM). Durch Messen der der OD₆₀₀ wurde die Zelldichte entsprechend den Vorgaben des Herstellers auf 2-6 eingestellt. (Anhaltspunkt OD₆₀₀ von 1 entspricht $\sim 5 \times 10^7$ Zellen) Die Größe der Expressionsansätze variierte von 10ml Kulturvolumen beim Screenen von Klonen bis maximal 250ml für sog. *High-Performer*. Regelmäßige pH-Wert Messungen sowie Probenentnahmen wurden bei der Etablierung optimaler Produktionsbedingungen ebenso durchgeführt wie das Verändern der Methanol-Konzentration (0,5 - 2% Endkonzentration (v/v)) und der Induktionsintervalle (12 – 36 h). Die Dauer einer Expression betrug 4 -7 Tage. Da der Expressionskassette ein Signalpeptid (α -Factor prepro-Peptid aus *S. cerevisiae*) vorgeschaltet war, erfolgte eine Sekretion und es konnte aus dem konditioniertem Überstand aufgereinigt werden.

3.2.4.3.5 Screening der Klone

Um die unterschiedlich starken Expressionsfähigkeiten verschiedener *Pichia*-Klone quantitativ vergleichen zu können, wurde der Überstand einer Expressionskultur mit Hilfe der Dot-blot-Analyse (siehe 3.2.1.7) zum Nachweis auf rekombinantes Protein untersucht. Dabei wurden die Signalstärken von Epitop_{tag}-vermittelten Antikörperreaktionen (Anti-His₆, Anti-myc) direkt mit Bandenintensitäten, welche durch FGF-BP-spezifische Antikörper hervorgerufen wurden, miteinander verglichen. Expressionsansätze, die bei mehreren Antikörpernachweisen starke Signale ergaben, wurden einer Affinitätsreinigung unterzogen (siehe Abschnitt 3.2.4.5).

3.2.4.4 Affinitätsreinigung über Glutathion-Sepharose

Die Reinigung von GST-getagtem FGF-BP mit Glutathion-Sepharose (Typ 4B, Amersham) erfolgte unter nativen Bedingungen (adaptiert nach [261, 262]). Das Bakterienpellet wurde in eiskaltem STE-Puffer (150mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Tris pH 8,0, Proteaseinhibitor) gewaschen, erneut in STE-Puffer aufgenommen, und nach Zugabe von Lysozym (100 µg/ml) sowie 5mM DTT für 15 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Zusatz einer wäßrigen 1,5%igen Sarkosyllösung (w/v) (N-Lauroylsarcosin-Natrium, Fluka). Die Zellyse wurde für 30 min bei 4°C unter Schütteln durchgeführt. Anschließend wurde das Lysat mit Ultraschall behandelt (5 Intervalle zu je 10 sec, auf Eis), dann mit Triton X-100 (Sigma, Endkonzentration 2% (w/v)) versetzt, und für weitere 30 min unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die äquilibrierten Sepharosebeads direkt mit dem klaren Lysat vereint und für mindestens 2 h, besser ü.N., bei 4°C inkubiert (Bettvolumen ~ 500 µl). Vor der Elution wurde fünfmalig mit 10 ml PBS gewaschen. Die Elution wurde durch reduziertes Glutathion (GSH_{red}) sowie den Aufbau eines Ionengradienten ausgelöst. Jeweils 2 - 3

Elutionsschritte zu je 500µl des jeweiligen Puffers (E1 = 0mM NaCl, E2 = 250mM NaCl, E3 = 500mM NaCl, E4 = 1M NaCl, E5 = 2M NaCl; alle vorliegend in 10mM GSH_{red}, 5mM DTT, plus Protease-inhibitor) wurden vereint und fraktionsweise analysiert. Die Elution wurde langsam durchgeführt, um eine ausreichende Gleichgewichtseinstellung zu gewährleisten. Ein finaler Elutionsschritt mit 1% SDS-Lösung (w/v) resp. 1% Triton X-100 (w/v) wurde zu analytischen Zwecken durchgeführt, um alle auf der Säule verbliebenen Proteine forciert zu eluieren.

3.2.4.5 Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose

Durch das Anfügen eines His₆-tags an die rekombinanten Proteine war eine Reinigung über immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) ermöglicht [263]. Das Oligo-Histidin-Peptid befand sich je nach Expressionsvektor entweder C- oder N-terminal (s.u.). Die verwendeten Protokolle wurden dem *QIAexpressionist*®-Handbuch (Qiagen) entnommen.

Die Reinigung der in *E. coli* sowie Sf-9 Zellen hergestellten Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, da nur eine nicht-sezernierte, intrazelluläre Expression ausreichende Mengen an Produkt lieferte. Unter Verwendung des chaotropen Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl) und Harnstoff (starker Wasserstoffbrückenbrecher) wurden die Proteine in einen löslichen Überstand überführt. Die Solubilisierung des Zellsediments erfolgte in einem Lysepuffer (6M GuHCl, 100mM Na-Phosphat, 10mM Tris pH 8,0) durch Ultraschallbehandlung (5 Intervalle zu je 10 sec, auf Eis) und anschließendem Homogenisieren mit einem Dounce-Glasschliffhomogenisator (5 Hübe). Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C erfolgte eine Zentrifugation des Lysats bei 10.000g für 15 min. Der Überstand wurde mit dem äquilibrierten Säulenmaterial (Ni-NTA Agarose, Fermentas) für mindestens 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem Überführen der Suspension auf Chromatographiesäulen (Poly-Prep®, BioRad) erfolgten mehrere Waschschrte in Lyse- sowie Waschpuffer (8M Harnstoff, 100mM Na-Phosphat, 10mM Tris pH 8). Die Elutionen wurden durch den Aufbau eines pH-Gradienten in mehreren Stufen erreicht. Der durch das Ansäuern bedingte zunehmende Protonierungsgrad gebundener Histidinreste führte zum Ablösen der Fusionsproteine von dem Säulenmaterial. Elutionsstufen der pH-Werte 6,3 (Puffer C), 5,9 (Puffer D) und pH 4,0 (Puffer E) wurden gesammelt und fraktionsweise analysiert (vorliegend in 8M Harnstoff, 100mM Na-Phosphat, 10mM Tris pH x). Da Harnstoff unter Abspaltung von Ammoniak im Sauren schnell zerfällt, wurden die Puffer stets frisch angesetzt und unmittelbar vor Verwendung exakt auf den jeweiligen pH-Wert justiert. Die in denaturierenden Puffern vorliegenden Proteine waren nach dem Äquilibrieren auf pH 8 bei 4°C für mehrere Wochen lagerbar.

Für die Reinigung von *P. pastoris* FGF-BP konnten native Bedingungen eingehalten werden, da das sekretierte Protein im löslichen Überstand der Expressionskultur vorlag. Die Bindung des Proteins an das Säulenmaterial erfolgte durch direktes Zusetzen der äquilibrierten Agarose-beads zum konditionierten Überstand der Expressionskultur. Der pH-Wert von 8, bei dem die Bindung erfolgte,

wurde durch Zusatz von 1/10 Vol. eines 10x Bindepuffers (500mM Na-Phosphat pH 8,0) eingestellt. Ggf. wurde die Stringenz durch Variieren der Ionenstärke mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (100mM - 500mM) sowie Aufbau einer basalen Imidazolkonzentration (20 - 30mM) erhöht. Zur Elution diente der niedermolekulare Histidinkompetitor Imidazol in aufsteigenden Konzentrationen (250mM - 500mM). Um ein vollständiges Ablösen aller gebundenen Proteine zu erreichen, wurde eine Komplexierung des Nickels mit Chelatbildnern bzw. eine Zugabe von denaturierenden Detergentien durchgeführt. Eine finale Elution mit EDTA-Lsg. (50 - 100mM, pH 8,0) bzw. 1% SDS-Lösung fand zu analytischen Zwecken statt, um einen Nachweis über die Expressionstärke sowie Bindungscharakteristika der rekombinanten Proteine zu erhalten. Diese Elutionsstufen konnten jedoch nicht für weitere Experimente eingesetzt werden.

3.2.4.6 Affinitätsreinigung über Heparin-Sepharose

Das saure Polysaccharid Heparin kann als gruppenspezifisches Adsorbens für Wachstumsfaktoren verwendet werden (zur Übersicht [264]). Auch FGF-BP bindet mit hoher Affinität an die polyanionischen Gruppen der Glykosaminoglykane, so dass eine Proteinaufreinigung aus (über)exprimierenden Zellen mittels Heparin-Sepharose möglich war. Die Aufarbeitung erfolgte aus den konditionierten Medien der jeweiligen Zellkulturen und wurde zum Nachweis der (heterologen) Proteinexpression durchgeführt. Das Äquilibrieren der Sepharosebeads (Heparin-Sepharose CL-6B, Amersham) erfolgte in 10-fachem Bettvolumen mit Bindepuffer (50mM NaCl, 50mM Tris pH 7,4, mit einem Bettvolumen von ~500µl). Anschließend wurden die vor-gequollenen beads mit dem konditionierten Medium einer 4 - 6 Tage alten Kulturflasche bei 4°C ü.N. inkubiert (nach Zusatz von 1/10 Vol. eines 10x Bindepuffer). Nach fünfmaligem Waschen der Säule mit 1x BP erfolgte die Elution durch den Aufbau hoher Ionenstärken. Drei Stufen zu je 500µl des jeweiligen Hochsalzpuffers (E1 = 0,5M NaCl, E2 = 1M NaCl, E3 = 2M NaCl, in 50mM Tris pH 7,4) wurden vereint und fraktionsweise analysiert.

3.2.4.7 Affinitätsreinigung von Anti-FGF-BP_t-Antikörpern

Zur Aufreinigung des polyklonalen Anti-FGF-BP_t-Antikörpers wurde Serum von immunisierten Kaninchen auf pH 8,0 justiert (mit 1/10 Vol. 1M Tris pH 8,0) und zusammen mit zuvor äquilibrierten Protein-A Sepharosebeads (PAS CL-4B, Amersham) auf Chromatographie-Säulen (Poly-Prep[®], Bio-Rad) überführt (je ml Antiserum 1ml PAS-Suspension). Die Bindung der IgGs erfolgte für 3h bei 4°C unter ständigem Durchmischen. Anschließend wurde unter sukzessiver Verringerung der Ionenstärke gewaschen, mit zunächst 10 Säulenvol. einer 0,1M Tris-Lsg. pH 8,0 sowie anschließend zehn weiteren Säulenvol. mit 10mM Tris pH 8,0. Die Elution erfolgte fraktionsweise zu 500µl-Schritten in eine 100mM Glycin-Lösung pH 3,0. Fraktionen, deren Proteingehalt 1mg/ml überstieg, wurden vereinigt (i.d.R. Fraktionen 1 - 4), auf pH 8,0 gepuffert (Zusatz von 1/10 Vol. einer 1M Tris pH 8,0) und bei -20°C aliquotweise gelagert (Proteinmessung der A₂₈₀, mit ε_{IgG} ~1,4).

3.2.5 Proteinchemische und immunchemische Methoden

3.2.5.1 Präparation von Proteinextrakten aus Zellen und Gewebe

Zur Aufarbeitung von Proteinen aus kultivierten Zellen wurde der Monolayer zweimal auf Eis mit PBS gewaschen, vollständig trockengesaugt, und durch Abkratzen mit einem Zellschaber in Lyse-puffer (PBS, 5mM EDTA, Proteaseinhibitor) aufgenommen (je 6-Well ~200µl Puffer, je T25-Flasche ~500µl). Gewebe wurde in flüssigem N₂ in einem Mörser homogenisiert. Der Zellaufschluß erfolgte entweder durch Ultraschallbehandlung (5x 10 sec, auf Eis) oder dreimaliges Schockfrieren in flüssigem N₂. Nach Zentrifugation (10 min, 13.000rpm) wurde das klare Lysat bei -80°C gelagert.

3.2.5.2 Probenkonzentrierung und Umpufferung

Zur Aufkonzentrierung größerer Probenvolumina wurden Ultrafiltrationsröhren mit geeigneten molekularen Ausschlußgrenzen (MWCO) verwendet. Die MWCO der gewählten Membranen wurde mindestens um den Faktor 2 kleiner gewählt als die minimale Molekülmasse, die zurückgehalten werden sollte. Es kamen Vivaspin[®] Röhren (Sartorius), sowie Centricon[®]- und Microcon[®]-Röhren (Millipore) mit einem MWCO von 5.000, 10.000 sowie 30.000 kDa zum Einsatz. Zum Entfernen unerwünschter Bestandteile bzw. zum Überführen von Proteinlösungen auf die jeweiligen Reaktions-puffer wurde eine mehrmalige Probenaufkonzentrierung mit anschließendem Verdünnen mit der gewünschten Lösung durchgeführt und dadurch mindestens um den Faktor 1000 umgepuffert.

3.2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte nach der Bradford-Methode (mit phosphorsaurer Coomassie-Brilliant-Blue-G250-Lsg. [265]) sowie mit Hilfe des kommerziellen *D_C-Protein-Assays* (BioRad). Als Standard diente eine Lösung von bovinem Serumalbumin (Albumin Fraktion V proteasefrei, Roth) bekannter Konzentration. Die Herstellung der Eichgerade erfolgte in dem jeweiligen Puffersystem, in welchem die zu testende Probe vorlag. Für die Bradford-Methode wurden 2µl Probelösung (annäherender Konzentrationsbereich 0,1 - 2 mg/ml, ggf. wurde die Probe zuvor verdünnt) mit 98µl ddH₂O vermischt, mit 1,5ml Bradford-Reagenz (5% ethanolische Coomassie-Lsg., 2,5mg/ml, 10% *o*-Phosphorsäure, in monodest. H₂O) versetzt und nach 5-minütiger Inkubation bei 595 nm vermessen. Die erhaltenen Absorptionen wurden von einem Leerwert (Pufferlösung ohne Protein) subtrahiert. Der BioRad-Assay funktionierte nach der Methode von Lowry [266] und war laut Hersteller kompatibel zu vielen ionischen und nicht-ionischen Detergentienzusätzen bis zu einer Endkonzentration von 1%. Die Durchführung erfolgte im 96-Well Format. 5µl Probe wurden mit 10µl eines Gemisches, bestehend aus Lösung „A“ (alkalische Kupfertartrat Lsg.) und der detergentienkompatiblen Lösung „S“ (Verhältnis 20:1) luftblasenfrei miteinander vermischt. Je Well wurden anschließend 80µl Lösung „B“ zugesetzt. Die Messung des reduzierten Folin-Reagenzes erfolgte nach 15 min bei 630nm in einem ElisaReader.

3.2.5.4 Dot blotting

Beim Dot blot erfolgte der Nachweis eines Proteins durch direktes Aufbringen der Probe auf ein Trägermaterial. Unter der Voraussetzung, dass ein Antikörper spezifisch nur das interessierende Protein erkennt, können mit dieser Methode schnell und verlässlich viele Proben gleichzeitig untersucht werden, ohne die vorherige Auftrennung über ein Gel durchführen zu müssen. Die Probelösung wurde in Form einer kreisförmigen Fläche auf eine Nitrocellulosemembran immobilisiert und analog zum Vorgehen beim Western blotting (siehe Abschnitt 3.2.5.5) weiterverarbeitet. Falls die notwendigen Volumina 3 µl überschritten, wurde der Probenauftrag in mehreren Schritten wiederholt und zwischenzeitlich solange gewartet, bis die Membran wieder komplett trocken war. Dadurch hatten alle *Dots* eine definierte Größe.

3.2.5.5 SDS-PAGE und Western blotting

Zur Auftrennung von Proteinen diente die diskontinuierliche Polyacrylamid-(PAA)-Gelelektrophorese mit Tris-Glycin Puffern nach der Vorschrift von Lämmli [267]. Die Acrylamidkonzentration wurde in Abhängigkeit von der Größenordnung der aufzutrennenden Proteine gewählt (12 - 19 % PAA, Rotiphorese Gel 37,5:1, Roth). Herstellungsvorschriften für Pufferlösungen sowie Zusammensetzung der einzelnen Gelkomponenten können den nachfolgenden Tabellen entnommen werden. Zur Darstellung von FGF-BP und dessen Deletionsmutanten wurde eine Vorschrift von Hashimoto [268] verwendet. Durch den Zusatz von 6 M Harnstoff zum 19% Trenngel konnten die instabilen Polypeptide mit einem Molekulargewicht von maximal 35 kDa am besten abgebildet werden. Um eine weitere Verbesserung zur Auftrennung kleiner Proteine zu erreichen, wurde ein 10% Spacergel zwischen Trenn- und Sammelgel gegossen (Methode nach Schägger & Jagow [269]). Die Zubereitung dieser zusätzlichen Gelkomponente erfolgte simultan mit dem Trenngel. Durch vorsichtiges Übersichten wurde das Spacergel unmittelbar nach Einbringen des noch flüssigen Trenngels in die Apparatur gegeben, so dass beide Phasen gemeinsam auspolymerisierten. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben, vorliegend in 1x Lämmli-puffer, für 5 min bei 95°C aufgekocht und ggf. zentrifugiert (nur Verwendung klarer Lysate). Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer. Zum Aufkonzentrieren der Proben im Sammelgel wurden 80 V angelegt, nach dem Einlaufen der Proben in das Trenngel konnte die Spannung auf 120 - 160 V erhöht werden. Der Transfer auf Nitrocellulose-Membranen (Porengröße 0,45 µm, Schleicher&Schuell) erfolgte im *semi-dry* blot. Dazu wurden Filterpapiere auf die Größe des Gels geschnitten, in den unterschiedlichen Transferpuffern inkubiert, und durch Luftblasen-freies Auflegen nach folgender Reihenfolge in die Blotkammer überführt: 6 Lagen Papier (getränkt in Anodenpuffer I), 3 Lagen Papier (mit Anodenpuffer II), die Membran, das Gel (zuvor kurz im Kathodenpuffer gewaschen) sowie 9 Lagen Papier (mit Kathodenpuffer). Es wurde bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 60 - 90 min geblottet. Zum Überprüfen der Transfereffizienz diente die reversible Membranfärbung mit Ponceau-S-Lösung. Das Absättigen freier Bindestellen auf der

Nitrocellulosemembran wurde mit der Blockierungslösung durchgeführt, welche bei den jeweiligen Antikörpern das beste Signal-Hintergrundsverhältnis ergab (Blockieren für 60 min bei RT).

Gelkomponente	Menge für 2 Gele (à ~15ml)
Sammelgel (4% PAA)	1 ml Rotiphorese Gellösung 1,25 ml 4xSammelgelpuffer 3 ml ddH ₂ O 50 µl 10% APS 20 µl TEMED
Spacergel (10% PAA)	5 ml Rotiphorese Gellösung 3,75 ml 4xTrenngelpuffer 6,2 ml ddH ₂ O 100 µl 10% APS 20 µl TEMED
Trenngel (19% PAA)	9,5 ml Rotiphorese Gellösung 1,75 ml ddH ₂ O 3,75 ml 4xTrenngelpuffer 5,4g Harnstoff 100 µl 10% APS 20 µl TEMED

Zusammensetzung der Gelkomponenten einer SDS-PAGE zur Auftrennung von FGF-BP.

Puffer	Zusammensetzung
4x Lämmli-Probenpuffer	0,25 M Tris/ HCl pH 6,8 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol 20 % (v/v) Glycerin ~0,01 % (w/v) Bromphenolblau 8 % (w/v) SDS
10x TBST (Tris-buffered saline/ Tween 20)	1,5 M NaCl 100 mM Tris pH 7,4 0,5 % Tween 20
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris (30g/l) pH 8,3 2 M Glycin (144g/l) 1 % (w/v) SDS
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
Anodenpuffer I	0,3 M Tris pH 10,4 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	0,025 M Tris pH 10,4 20 % (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	40 mM Aminocaprinsäure pH 7,6 20 % (v/v) Methanol

Zusammensetzung der Puffer beim Western blotting.

3.2.5.6 Handhabung und Färbung von Gelen

Zur unspezifischen Anfärbung von Proteinen in Acrylamidgelen wurde je nach gewünschter Nachweisgrenze entweder mit Coomassie-Brilliant-Blue oder Silberlösung gefärbt. Für eine Coomassie-Färbung wurde das Gel mindestens 3 h, besser ü.N., in einer frisch filtrierten Färbelösung (30% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,5g/l Coomassie Brilliant-blue R-250) inkubiert und bis zur gewünschten Intensität entfärbt (Entfärber: 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure). Die Silberfärbung nach Blum *et al.* [270] erfolgte nach dem untenstehenden Protokoll. Zur Langzeitlagerung wurden die Gele für mindestens 1 h in einer hygroskopischen Lösung getrocknet (50% Methanol, 7% Glycerin (w/v)), anschließend luftblasenfrei in Einmachfolie gewickelt, auf eine Trockenapparatur gespannt und unmittelbar nach der Färbung im Durchlicht fotografiert.

Schritt	Reagenz	Dauer
Fixierung	50% (v/v) Ethanol 12% (v/v) Essigsäure	>1 h
Waschen	50% (v/v) Ethanol	3 x 20 min
Quellen	ddH ₂ O	1 x 20 min
Reduktion	0,02% Na ₂ S ₂ O ₃ (10mg Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O in 50 ml ddH ₂ O)	1 min
Waschen	ddH ₂ O	3 x 10 sec
Färbung (Imprägnierung)	0,2% AgNO ₃ 0,02% Formaldehyd (37%) (100mg AgNO ₃ + 25µl Formaldehyd (37%) in 50 ml ddH ₂ O (frisch zubereitet)	15 – 20 min
Waschen	ddH ₂ O	3 x 20 sec
Entwicklung	6% Na ₂ CO ₃ 0,02% Formaldehyd (37%) (3g Na ₂ CO ₃ , 25µl Formaldehyd (37%) in 50 ml ddH ₂ O (frisch zubereitet)	bis zur gewünschten Signalintensität (~1 – 5 min)
Stopplösung	10% (v/v) Essigsäure	1 min

Ablauf der Silberfärbung von Gelen, modifiziert nach Blum et al. [270].

3.2.5.7 Antikörper-Nachweis, Visualisierung und Quantifizierung des Signals

Falls nicht anders angegeben, wurde die Primärantikörperinkubation bei 4°C standardmäßig ü.N. durchgeführt, die Behandlung mit Sekundärantikörper (angesetzt in Blockierungslösung) erfolgte für 1 h bei RT. Alle Waschschritte wurden durch dreimaliges Auswechseln von frischem TBST für mindestens 5 - 10 min durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte über Chemilumineszenz durch Verwendung Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper (HRP-Konjugate) in der Dunkelkammer. Je nach erforderlicher Sensitivität musste die Detektion entweder mit den ECL-Substraten *SuperSignal*,

West Femto oder *West Pico* (Pierce) durchgeführt werden. Die Länge der Filmexposition (*Hyperfilm ECL*, Amers-ham) betrug zwischen 10 sec und 60 min. Bei quantitativen Immunfärbungen wurde mit äquivalenten Probenauftragsmengen gearbeitet und zunächst die Ladekontrolle entwickelt. Signale, welche erst nach 30 min (oder einem längeren Zeitraum) zu einer Färbung des Films führten, wurden nicht für eine Quantifizierung verwendet. Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte über Densitometrie durch Verwendung von ImageJ®. Die gemessenen Graustufen wurden nach Subtraktion eines Hintergrundsignals vom spezifischen Signal wurden auf die Färbeintensität der Ladekontrolle normiert.

3.2.5.8 [¹²⁵I]-Markierung von Proteinen

Zur radioaktiven Markierung von FGF-BP und HMGA wurde das Fremdatom [¹²⁵I] verwendet. Der Mechanismus des kovalenten Einbaus von I⁺-Kationen in Tyrosylreste der Proteinseitenkette erfolgte nach einem radikalischen Mechanismus. Als Oxidationsmittel diente N-chloro-p-toluen-sulfonamid (Chloramin-T). Für einen Markierungsansatz wurden 10µg gereinigtes Protein (vorliegend in 80µl 200mM Na-Phosphat pH 8,2) mit 500µCi Na[¹²⁵I] sowie 40µl einer frisch hergestellten Chloramin-T Lösung (1mg/ml) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch den Zusatz von 12µl einer 200mM DTT-Lösung abgestoppt. Nicht-eingebautes Iod konnte durch Gelfiltration (Micro Bio-Spin Chromatography Columns, Bio Rad) entfernt werden. Die Einbaurate wurde mit einem Geigerzähler kontrolliert.

3.2.5.9 Liganden-Dot blots und Far-Western

Beim Liganden Dot blot diente ein auf einer Membran immobilisiertes Protein als Köder (*bait*) für einen Interaktionspartner (sog. Filterbindungs-Assay). Durch Nachweis des gebundenen Partners (*prey*) an der Stelle des immobilisierten Liganden konnte so auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen geschlossen werden. Beim Far-Western blot wurde eine vorherige SDS-PAGE des *bait*-Proteinen durchgeführt. Das geblottete Gel wurde analog zum Dot blot weiterverwendet. Die Detektion der spezifischen Protein-Protein-Interaktion erfolgte entweder direkt über Autoradiographie und [¹²⁵I]-markierten Proben (siehe Abschnitt 3.2.5.8) oder mit Hilfe eines Antikörpers gegen das *prey*-Protein. Zum Auffinden neuer Interaktionspartner von FGF-BP wurden 100-300ng *bait*-Protein auf einer Membran gebunden und, nach dem Blockieren, mit einer FGF-BP-haltigen Lösung (c~1mg/ml), angesetzt in Blockierungspuffer (2% BSA in TBST), unter leichtem Schütteln inkubiert (ü.N. bei 4°C bzw. bei RT für 4h). Die Immundetektion erfolgte mit Epitop-*tag*-Antikörpern bzw. FGF-BP-spezifischen IgGs (siehe Abschnitt 3.2.5.7). Eine autoradiographische Visualisierung wurde durch Verdünnen der radioaktiven Proteinlösungen aus Abschnitt 3.2.5.8 in Blockierungspuffer durchgeführt (~1:100 - 1:10.000).

3.2.5.10 Charakterisierung von Protein-DNA-Bindung (*South-Western blot*)

Zum Nachweis der Affinität von FGF-BP zu Nukleinsäuren wurden Lösungen von rekombinantem Protein analog Abschnitt 3.2.5.4 auf Nitrozellulose fixiert und als *bait* eingesetzt. Aufgrund von Protein-DNA-Wechselwirkungen blieben die Nukleinsäuren spezifisch an dem immobilisierten Interaktionspartner haften. Diese Reaktion war durch Einsatz einer radioaktiven Gensonde autoradiographisch detektierbar.

3.2.5.11 *In vitro*-Stabilitätsuntersuchung von FGF-BP

Zur Durchführung von *in vitro*-Stabilitätsuntersuchungen von FGF-BP wurden Lösungen von frisch aufbereiteten Proteinreinigungen unmittelbar vor dem Experiment in ein physiologisches Medium (PBS) umgepuffert (siehe Abschnitt 3.2.5.2) und sofort weiterverwendet. Zusätze wie DNA, DNase, Proteaseinhibitoren wurden in der Weise hinzugegeben, dass alle Reaktionsansätze gleiche Endkonzentrationen an rekombinantem Protein beinhalteten (Gesamtvolumen ~150 µl). Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte nach definierten Zeitpunkten durch direktes Aufbringen („*dotten*“) eines Aliquots aus dem Reaktionsansatz auf eine Nitrocellulose-membran bzw. Überführen in Lämmli-puffer. Die Immundetektion wurde gemäß Abschnitt 3.2.5.7 durchgeführt.

3.2.5.12 Expressionsanalysen mit Antibody-Arrays

Zur Bestimmung der Phosphorylierungsgrade von MAP-Kinase(MAPK)-Signaltransduktionsmolekülen sowie zur Expressionsanalyse von Apoptose-assoziierten Proteinen wurden Antibody-Arrays eingesetzt, welche eine parallele Detektion relativer Aktivierungszustände bzw. Expressionslevel der Zielgene ermöglichten. Dazu wurden Lysate aus den zu untersuchenden Zellen nach Vorgaben des Herstellers hergestellt und mit Membranen, auf welchen die (Phospho-)spezifischen *Capturing*-Antikörper aufgebracht waren, inkubiert. Die den Kits beiliegenden biotinylierten Detektionsantikörper (*Detection-Antibody Cocktail*) konnten über eine Streptavidin-HRP-Reaktion gemäß Abschnitt 3.2.5.7 visualisiert und quantifiziert werden. Je Array wurden 300 – 500 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die so hergestellten Lysate waren ferner auch zur Durchführung von Western blot-Analysen geeignet. Relative Änderungen in der Expression bzw. Phosphorylierung um mehr als den Faktor 1,5 wurden näher betrachtet.

3.2.5.13 Apoptose-Assays (Caspase 3/7-Aktivitätstests)

Zur Detektion von Apoptose wurde ein Aktivitätstest der Effektorcaspasen 3 und 7 durchgeführt. Die Messung erfolgte mit Derivaten des Tetrapeptids DEVD (=Asp-Glu-Val-Asp), welche mit unterschiedlichen Reportern konjugiert waren (DEVD-Sequenz=Substraterkennungsstelle für Caspasen, zur Übersicht [271, 272]).

Beim Assay mit Ac-DEVD-AMC (Alexis) führte die durch aktive Caspasen katalysierte Abspaltung des Farbstoffs 7-Amino-4-methylcumarin (=AMC) vom Tetrapeptid zu einem fluorimetrisch erfaßbaren Produkt, welches im Reaktionsansatz akkumulierte. Die gemessenen Fluoreszenzsignale wiesen dadurch eine zeitabhängige Sättigungskinetik auf. Die Durchführung erfolgte im 6-Well mit initial 10^5 eingesäten Zellen. Der mit PBS zweimalig vorsichtig gewaschene Monolayer wurde nach dem entsprechenden Behandlungszeitraum mit einem Zellschaber abgelöst und in 300µl Lysepuffer (150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 10mM DTT, 50mM Tris pH 7,4, Proteaseinhibitor) resuspendiert. Für einen Zellaufschluß wurde die Probe dreimalig in flüssigem N₂ schockgefroren bzw. mit Ultraschall behandelt (3x10 sec). Nach Abzentrifugieren des zellulären Debris wurden 30 - 50µg des klaren Lysats, vorliegend in 40µl Reaktionspuffer (10mM DTT in PBS, Proteaseinhibitor) mit 10µl Substratverdünnung in einer weißen 96-Well-Platte vermischt (Arbeitskonzentration Ac-DEVD-AMC=25µM). Die Messung erfolgte in definierten Zeitabständen (alle ~10 min) mit einem temperierten Elisa-Reader bei 37°C (*Fluostar Optima Reader*, BMG Labtec, $\lambda_{\text{Ex}}=380\text{nm}$, $\lambda_{\text{Em}}=475\text{nm}$).

Durch kovalente Kopplung von DEVD an Luminol war die Quantifizierung der Caspaseaktivität mittels Biolumineszenz möglich. Das verwendete *LumiGlo3/7-Kit* (Promega) bestand aus einem Lysepuffer, der zusätzlich zum Substrat ebenfalls die notwendige Luciferase beinhaltete. Bei dieser Methode erfolgte die Aktivitätsmessung in einer Gleichgewichtsreaktion (Lichteinheiten pro Zeit, RLU). Je 96-Well wurden $5-10 \times 10^3$ Zellen eingesät und für den gewünschten Zeitraum inkubiert (48 – 72 h). Für eine Messung wurde ein Mediumswechsel mit 100µl eines Reaktionsansatzes, bestehend aus 50µl LumiGlo-Reagenz und 50µl frischem Kulturmedium, vorgenommen und nach 30 - 60 min Inkubation (bei 27°C, im Dunkeln) die Luciferaseaktivität mit einem Elisa-Reader aufgezeichnet. Um Unterschiede in der Zelldichte zu normieren, wurde auf derselben Platte in einem parallelen Ansatz eine WST-1-Messung durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.6.13). Die Caspaseaktivität konnte so auf die Gesamtzahl der vorhandenen Zellen normiert werden (RLU/A₄₅₀). Um Streusignale aus benachbarten Bereichen zu unterbinden wurde immer ein Well ausgespart. Im Verdunstungseffekte zu minimieren wurden zellfreie Wells mit PBS befüllt.

Bei allen Reaktionen wurde ein Leerwert, bestehend aus Substrat ohne Zelllysate, mitgeführt und vom spezifischen Signal subtrahiert. 5-FU behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle (bei 48-stündiger Inkubation: 250µM für LS174T resp. 1000µM für ME-180, bei 72 h Inkubation die jeweils doppelte Konzentration).

3.2.6 Methoden in der Zellkultur und *in vivo*-Modelle

3.2.6.1 Allgemeine Methoden

Die Durchführung aller Experimente in der Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen sowie aseptischer Arbeitsweise unter einer Laminar Air Flow (LAF). Auf den routinemäßigen Einsatz von antibiotikahaltigen Medien wurde verzichtet, insbesondere bei laufenden Experimenten. Ggf. erfolgte eine Mykoplasmen-Behandlung mit *Normocin*® (InvivoGen) für die Dauer von 3 - 5 Subkultivierungen (~1 - 2 Wochen). Alle Zellen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert. Zur Zellzahlbestimmung diente eine Neubauer-Zählkammer.

3.2.6.2 Kultivierung und Konservierung

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Säugerzellen unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) in IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's medium*, PAA) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS)²⁷ kultiviert. Es kamen ausschließlich adhärente Zelllinien zur Verwendung. Bei einer Konfluenz von ~80% erfolgte die Subkultivierung der Zellen durch Trypsinbehandlung des mit PBS gewaschenen *Monolayers* und Aufnahme der Zellsuspension in frisches serumhaltiges Medium. Eine Passagierung in neue Kulturflaschen wurde nach spätestens 6 Wochen durchgeführt. Zur Langzeitkonservierung wurden logarithmisch wachsende Zellen abgelöst, 5 min bei 600rpm abzentrifugiert, in Einfriermedium (IMDM, 20% FCS, 5% DMSO, sterilfiltriert) aufgenommen und in Kryoboxen langsam auf -80°C abgekühlt. Die Lagerung fand in flüssigem N₂ statt (Gas- oder Flüssigphase). Die Inkulturnahme von Zellen erfolgte durch rasches Auftauen der Kryostocks im Wasserbad (37°C) und Überführen in ein großes Volumen an vorgewärmtem Kulturmedium. Nach dem Anheften der Zellen wurde ein Mediumswechsel durchgeführt, um toxische DMSO-Reste zu entfernen (~3 - 12 h nach der Einsaat).

3.2.6.3 Stabile und transiente Transfektion von DNA

Für DNA-Transfektionen wurden die polykationischen Komplexbildner *FugeneHD* (Roche) und *TurboFect* (Fermentas) verwendet, mit den von den Herstellern standardmäßig vorgeschlagenen Ratios. Um die Transfektionseffizienz einer zu ermitteln, wurde in einem Parallelexperiment unter gleichen Bedingungen ein Luciferase-Expressionsplasmid (pGL3-Control, Luciferase-Assay-System, Promega) transfiziert und nach 48 – 96 h die Enzymaktivität in einem Luminometer (FB12, Berthold) gemessen. Beim stabilen Einbringen von DNA mit anschließender klonaler Selektionierung (siehe Abschnitt

27) verschiedene Hersteller, sofern nicht anders erwähnt, wurde FCS von Gibco verwendet.

3.2.6.4) erfolgte die Transfektion bei ~30%iger Konfluenz der Zellen. Für eine 6-cm Schale wurden 5 - 8µg DNA verwendet (~500.000 Zellen), je 6-Well 1 - 2µg DNA (~100.000 Zellen).

Der Selektionsdruck wurde 36 – 48 h nach der Transfektion auferlegt und mindestens solange aufrecht erhalten, bis alle nicht-transfizierten Kontrollzellen abgestorben waren. Transfektionen zum Etablieren doppelt-stabiler Zellen erfolgten mit einem 10-fach molaren Unterschuß eines zweiten Selektionsmarkergens (Hygromycinresistenz als Bestandteil von pcDNA3.1*Hygro*, Plasmid wurde vor der Transfektion mit *Bgl*III linearisiert und gereinigt). Bei transienten Transfektionen lag die Zelldichte zum Zeitpunkt der Komplexzugabe bei ~70%.

3.2.6.4 Selektion auf stabile Expression und Isolierung resistenter Klone

Die klonale Selektionierung nach einer stabilen Transfektion von shRNA-Expressionsplasmiden war notwendig, da nicht alle erhaltenen Transfektanten die gewünschte Eigenschaft aufwiesen (*i.e. knock-down* des Zielgens). Zur Isolierung resistenter Klone wurden einzelne Kolonien eines Transfektionsansatzes durch das Aufsetzen von Klonierungsringen (Sigma), deren unterer Rand mit Silikon überzogen war, in der Kulturschale vereinzelt. Es wurde darauf geachtet, dass pro Ring nur eine Kolonie eingefasst war. Unter Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurde der Klon für weitere 4-6 Tage propagiert. Anschließend wurden die Zellen nach Trypsinzugabe durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in zwei 24-Wells überführt. Ein Well diente der Gewinnung von genomischer DNA, um die Anwesenheit des Zielvektors zu analysieren (siehe Abschnitt 3.2.1.8). Die Zellen aus dem anderen Well wurden sukzessive in größere Kulturgefäße passagiert, sofern die transfizierte shRNA-Expressionskassette stabil in das Genom integriert war.

3.2.6.5 Bestimmung der Geneticintoleranzdosis

Sofern die toxische Schwelle des Selektionsantibiotikums G418 (Geneticin®) für eine gegebene Zelllinie nicht in der Literatur beschrieben war, erfolgte deren Ermittlung mit den entsprechenden parental Zellen. Dazu wurden exponentiell wachsende *wt*-Zellen täglich mit frischem Selektionsmedium, hergestellt mit aufsteigenden G418-Konzentrationen, versetzt, und solange weiterkultiviert, bis die Toxizität des Aminoglykosids deutlich erkennbar war (~4 - 7 Tage). Die niedrigste Konzentration, bei welcher *alle wt*-Zellen abgestorben waren, wurde zur Erzeugung des Selektionsdrucks für weitere 1 - 2 Wochen aufrechterhalten (siehe nachfolgende Tabelle).

Zelllinie	[G418]
COS-7	1000 µg/ml
LS174T	750 µg/ml
ME-180	750 µg/ml
SW-13	1000 µg/ml

3.2.6.6 Zellzyklusmessung und Durchflußzytometrie (FACS)

Zur phasenspezifischen Analyse einer Zellpopulation mittels Durchflußzytometrie wurde eine Färbung nukleärer DNA durchgeführt (Propidiumiodid(PI)-Methode). Da sich im Laufe des Zellzyklus der DNA-Gehalt ändert, konnte über das Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignalstärken ein Histogramm erstellt werden, in welchem jedes von einer Einzelzelle vermittelte Signal einer bestimmten Zellzyklusphase zuzuordnen war. Bedingt durch die ionische Struktur kann PI jedoch intakte Zellmembranen nicht durchdringen. Deshalb ist zur Messung lebender Zellen deren Permeabilisierung erforderlich. Desweiteren interferieren ebenfalls einzelsträngige Nukleinsäuren (RNAs) mit dem Fluoreszenzfarbstoff und müssen daher entfernt werden. Die Durchführung erfolgte in 6-Well mit $\sim 3 \times 10^5$ Zellen. Für eine Ernte wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und mit PBS gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei maximal 2.500rpm durchgeführt. Die Permeabilisierung erfolgte für 1 h mit 1ml 70% EtOH in PBS (w/v) bei -20°C . Auf dieser Stufe waren die Proben mehrere Tage lagerbar. Das mit PBS gewaschene Zellpellet wurde in RNase A-haltiger PBS-Lösung (50µg/ml) resuspendiert und für 30 min bei 37°C , besser ü.N. bei 4°C , inkubiert. Die Zugabe von PI (Endkonzentration 25 - 50µg/ml) erfolgte erst unmittelbar vor der Messung. Um geringe Unterschiede einzelner Zellpopulationen herausarbeiten zu können, musste ggf. ein Zellzyklusarrest induziert werden (sog. *M-trapping*). Durch die kurzzeitige Vorbehandlung der Zellen mit dem Spindelgift Nocodazol (Prometaphasestopper) konnten die Zellkulturen dadurch synchronisiert werden. Der Arrest wurde nach maximal 18 - 24 h durch zweimaliges Waschen mit PBS und einen nach-folgenden Mediumswechsel wieder aufgehoben. Synchronisierte Zellen wurden für maximal 2 - 3 Verdoppelungszeiten weiterkultiviert, Zellen im forcierten Mitoseblock (*M-trap*) wurden sofort geerntet. Die Analyse erfolgte an einem FACS-Calibur[®] (Becton-Dickinson) durch Messen der drei Parameter Breite, Tiefe und Fläche von FSC (*forward scatter*, Vorwärtsstreulicht) sowie SSC (*side scatter*, Seitwärtsstreulicht) im PI-Kanal (FL-2). Das Setzen der *Gates* sowie das Diskriminieren von Aggregaten und Zelldoublets erfolgte in Bezugnahme auf unbehandelte Zellen (UT, *untreated*). Mindestens 20.000 singuläre Ereignisse wurden aufgezeichnet und mittels Cell-Quest[®]-Software ausgewertet. (FL2_{Area} vs. *counts*). Die Verteilung der einzelnen Phasen erfolgte intuitiv unter gleichbleibenden Bedingungen für Probe- und Kontrollzellen.

3.2.6.7 Methoden zur Verminderung der FGF-BP-Expression: Ribozym-Targeting

Der spezifische Abbau der FGF-BP-mRNA über Ribozym-*targeting* erfolgte mit Hilfe sog. *hammerhead*-Ribozyme (Originalstruktur abgeleitet von Haseloff und Gerlach [273]). Die vektorbasierte, stabile Expression der Ribozyme (vorliegend in pRcCMV, Invitrogen) stand unter Kontrolle des viralen CMV-Promotors [274] und führte zu einem konstitutiven *knockdown* der FGF-BP-mRNA (Ribozym-Sequenzen finden sich bei Czubayko *et al.* [275]). Die katalytische Aktivität der Ribozyme wurde initial bei der Etablierung dieser Zelllinien mittels *in vitro*-Transkription bestätigt [147]. Um die Anwesenheit des Ribozym-Expressionsvektors in den Zellen zu überprüfen, wurde eine Insert-PCR mit gDNA (siehe Abschnitt 3.2.1.8) sowie G418-Selektionierung stabiler Zellen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.6.5).

3.2.6.8 Transfektion von siRNAs

Zur transienten *downregulation* von FGF-BP wurden siRNAs mit INTERFERin® (Polyplus) bzw. niedermolekularem Polyethylenimin (F25-LMW-PEI,²⁸, kurz PEI, Labor AG Aigner) komplexiert. Die Komplexierung mit INTERFERin® erfolgte gemäß Herstellervorschrift unter Einhaltung einer 1:1 Ratio ($m_{\text{siRNA}}:\text{Vol}_{\text{INTERFERin}}/\mu\text{l}$) in serumfreien Medium (IMDM). Das Massenverhältnis bei der Komplexierung mit PEI erfolgte chargenabhängig von der jeweiligen PEI-Fraktionierung, zumeist 1:5 ($m_{\text{siRNA}}:\text{mg}_{\text{PEI}}$). Der PEI/Nukleinsäure-Ansatz wurde in einem HEPES/ NaCl-Puffer (HN-Puffer: 150mM NaCl, 10mM HEPES pH 7,4, sterilfiltriert) hergestellt und nach einer 20-minütigen Inkubation zu den Zellen pipettiert. Um eine gleichmäßige Komplexbildung zu gewährleisten sowie Sedimentationsprozesse zu verhindern, wurde während dieser Phase mehrmals gevortext. Simultan zur Transfektion wurde ein Mediumswechsel durchgeführt. Nach der Komplexzugabe wurden die Zellen i.d.R. bis zum Erntezeitpunkt in dem Transfektionsmedium weiterkultiviert. Der beste *in vitro*-*knockdown* wurde durch eine siRNA-Doppeltransfektion mit INTERFERin, im Abstand von 48 h, erzielt. Für eine Transfektion im 6-Well wurden 8 - 20 pmol siRNA eingesetzt, bei simultaner Transfektion in unterschiedlich großen Formaten erfolgte eine den Zellzahlen entsprechende Anpassung der Komplexmenge unter Verwendung eines einheitlich hergestellten Transfektionsansatzes. Der *silencing-effect* wurde in Abhängigkeit vom gewünschten Detektionslevel (mRNA- oder Proteinebene) 24 – 72 h nach der zweiten Transfektion ermittelt. Die siRNAs wurden in 100µM Stammlösungen bei -20°C aliquotweise gelagert und in einer Arbeitskonzentration von 1µM (=1pmol/µl) verwendet.

28) Sog. F25-LMW-PEI wurde über Gelpermeationschromatographie von kommerziell erhältlichem 25 kDa-PEI (Sigma) im Labor der AG Aigner fraktioniert und stellt ein Gemisch von 5-10 kDa langen Polyethylenimininen dar, freundlicherweise von Sabrina Höbel zur Verfügung gestellt.

3.2.6.9 Tet-on-System und vektorbasiertes FGF-BP-targeting (shRNA-Expressionsvektoren)

Zur Etablierung eines robusten *in vitro*-Systems zum induzierbaren Gen-*knockdown* für FGF-BP wurde der pSingle-tTS-Vektor (Clontech) gewählt. Das Plasmid verfügt über eine induzierbare Expressionskassette, welche aus zwei zueinander komplementären siRNA Sequenzen (19 nt.) besteht und die durch einen 9 nt. langen *hairpin loop* (TTCAAGAGA) voneinander getrennt sind. Die Expression der sog. shRNA (*small hairpin RNA*) wird unter Kontrolle des U6 Pol III Promotors initiiert, so dass ein strukturell nicht modifiziertes RNA-Transkript (keine 5'-Cap-Struktur bzw. 3'-Poly-A-Schwanz) mit festgelegtem Start- und Endpunkt entsteht [276, 277]. Die beiden komplementären Bereiche des Transkripts hybridisieren miteinander und bilden dadurch die charakteristische Haarnadelstruktur (*hairpin*) einer shRNA. Die definierte Spaltung nach der zweiten Base (Uridin) innerhalb der Polymerase(Pol)III-Terminatorsequenz (TTTTTT) bewirkt, dass die RNA mit dTdT-Überhängen versehen wird. Nach dem Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma erkennt Dicer die shRNA als Substrat und spaltet den einzelsträngigen *hairpin* nukleolytisch ab. Im Folgenden liegt die RNA intrazellulär als 21 nt. lange doppelsträngige siRNA vor. Diese wird in den RISC eingebaut, aktiviert diesen dadurch und führt folglich zum Zerstören der komplementären Ziel-mRNA. Auf diese Weise kann auch über Monate hinweg ein Zielgen stabil herunterreguliert werden [216]. Laut Hersteller unterliegt die shRNA-Expression einem chemisch induzierbaren Mechanismus durch Doxycyclin (Tet-on System), d.h. die Kultivierung von stabil-transfizierten Zellen in antibiotikahaltigem Medium führt zur gezielten Produktion der gewünschten Nukleinsäuren²⁹.

Die Klonierung der shRNAs erfolgte durch das Ligieren von zwei synthetischen Oligonukleotide in das linearisierte Leerplasmid (Die Oligonukleotide waren von einer *XhoI* resp. *HindIII*-Stelle flankiert, *sense*- und *Antisense*-Strang wurden vor der Ligation annealt). Um den Erfolg des Einbaus der kurzen Inserts in den Vektor zu überprüfen, wurden Klone der Ligationsplatte mittels Colony-PCR (siehe Abschnitt 3.2.1.7) analysiert und die entstandenen PCR-Produkte mit einer genspezifischen Sonde hybridisiert (PCR-Southern-Hybridisierung, siehe Abschnitt 3.2.1.11). Dieser Schritt war notwendig, da durch das Einbringen der Oligonukleotide in das Leerplasmid ein ebenso großes Stück Vektorrückgrat entfernt wurde und über die alleinige Größe des PCR-Produkts nicht ermittelt werden konnte, ob ein spezifischer Einbau des Inserts stattfand.

29) Diese Methode eignet sich damit auch, um transgene Tiere zu generieren, welche ihren eigenen regenerativen Pool zur Bildung einer siRNA bilden. Durch die Verabreichung von Dox/Tet-haltigem Trinkwasser kann so die Genexpression kontrolliert werden.

Die siRNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der in Abschnitt 3.2.3 genannten Programme abgeleitet. Übereinstimmende Vorschläge aus mehreren Suchalgorithmen wurden in Hinblick auf etwaige Sequenzhomologien zu weiteren humanen Transkripten, welche zu unspezifischen *off-target*-Effekten führen könnten, mittels BLAST überprüft. Es wurden nur *FGF-BP1*-spezifische Vorschläge weiterverwendet. Die so ermittelten Sequenzen wurden mit den Suffixen “A“, “B“, “C“ versehen und sind der zu entnehmen (siehe Abschnitt 3.1.4). Als Kontrollen wurden shRNAs gegen die beiden Luciferase-Gene *Luc2* und *Luc3* abgeleitet (eine Übersicht über geeignete Kontrollen befindet sich unter [278]).

3.2.6.10 *In vivo*-Transfektion von PEI/siRNA-Komplexen

Die *in vivo*-Transfektion von siRNAs erfolgte durch intraperitoneale (*i.p.*) Injektion mit 10µg (0,77nmol) von PEI-komplexierten Nukleinsäuren (siehe Abschnitt 3.2.6.8) pro Tier, in 2-3 täglichen Intervallen über einen Zeitraum von ~4 Wochen. Als Kontrollen diente eine Gruppe mit einer äquivalent komplexierten *Luc3*-siRNA (*siLuc3*, UR, *unrelated*) sowie eine Gruppe ohne Behandlung (UT, *untreated*).

3.2.6.11 *In vivo*-Wachstumskinetik von humanen Tumorexenotransplantaten

Um Wachstumscharakteristika von LS174T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden 10^6 Tumorzellen subkutan (*s.c.*) beidseits in jede Flanke von athymischen Nacktmäusen (nu/nu) injiziert. Nach Entwicklung stabiler Tumore (~5 Tage post Injektion) erfolgte die Einteilung der Mäuse in Behandlungs- und Kontrollgruppen mit mindestens 6 Tieren je Gruppe (Randomisierung bei gleichen Tumorgößen). Die Messung der Volumenzunahme der Tumore erfolgte alle 2-3 Tage bis zur Beendigung des Experiments (Volumenermittlung über die Formeln $(a \times b \times c)$ resp. $(a \times b^2):2$). Am Endpunkt wurden die Tumore entnommen, gewogen und für weitere Analysen (RNA-Isolierung, Proteinbiochemie, IHC) zerteilt. Die Probenkonservierung erfolgte durch Schockfrieren in flüssigem N₂ und Lagerung bei -80°C.

3.2.6.12 Soft-Agar Proliferationsassay

Proliferationsassays im Soft-Agar vermitteln näherungsweise eine *in vivo*-Situation, da die Zellen in eine halbfeste Matrix eingebettet werden, in welcher sie dreidimensional wachsen können. Dabei bilden sich Einzelzellen zu monoklonalen Zelllinien aus, welche mikroskopisch in Form von Kolonien (sog. CFUs, *colony forming units*) erkennbar sind (sog. klonogener Assay). Die phänotypisch leicht erkennbare Eigenschaft von Zellen, kontaktunabhängig zu wachsen, stellt insbesondere in der Tumorforschung ein gutes Modell dar, um Einflüsse von mitogenen Faktoren zu untersuchen und koloniestimulierende Wachstumsprofile zu erstellen.

Zur Durchführung eines Soft-Agar-Assays wurden in einem 6-Well zwei Agar-Phasen gebildet. Der zuerst gebildete Boden-Agar, bestehend aus einem ca. 1cm dicken 0,6%igen *Bottom-Layer* (~1,5ml Agargemisch, Bacto Agar, Becton Dickinson), diente als Basis sowie Nährstoffreservoir. Der Top-Agar stellte die Matrix für die wachsenden Kolonien dar. Die Herstellung des Agargemischs erfolgte nach der untenstehender Vorschrift. Der in der Mikrowelle geschmolzene Agar wurde mit den auf 42°C vorgewärmten Komponenten vermischt und luftblasenfrei auf die Wells verteilt (temperiertes Wasserbad unter der Sterilbank, Kulturplatten und Pipetten im Brutschrank aufbewahrt). Die Herstellung des *Top*-Agars erfolgte, indem eine definierte Zahl gut vereinzelter Zellen dem Gemisch zugesetzt, und mit Kulturmedium verdünnt wurde (Endkonzentration des Agars ~0,35%). Dabei war die kritische Temperatur von 42°C keinesfalls zu überschreiten (zur Verhinderung einer Proteindenaturierung). Alle Ansätze erfolgten in Triplikaten mit jeweils 60.000 Zellen pro 6-Well. Um alle Zellen in ein einheitliches, proliferatives Stadium zu bringen, waren die Kulturflaschen 24 h vor der Einsaat trypsiniert und auf gleiche Zelldichte gebracht worden. Die Herstellung erforderte ein zügiges Arbeiten, da die Zell-Agar-Mischung nur im flüssigen Zustand homogen verteilt werden konnte. Die Platten wurden in regelmäßigen Abständen in Hinsicht auf das Wachstumsverhalten der Kolonien unter dem Durchlichtmikroskop beobachtet. Nach ca. 7 - 14 Tagen wurde die Anzahl der etablierten Kolonien mit Hilfe eines Okulars mit Zählraster ermittelt. Kolonien, deren Größe 50µm im Durchmesser überschritten, wurden in die Zählung mit einbezogen. Für die Quantifizierung dienten mehrere, voneinander unabhängige Beobachter, nachdem die zu untersuchenden Platten zuvor verblindet worden waren.

Substanz	Menge (ml)
2,4% Agar (w/v) in ddH ₂ O, autoklaviert	12,5
10x IMDM	1,25
IMDM / 10% FCS	37,5

*Herstellung des Agargemischs für einen Soft-Agar-Assay
(50ml ausreichend für ~30 6-Wells).*

3.2.6.13 Wachstumsassays mit WST-1

Zur Erfassung der *in vitro*-Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen wurde das Proliferationsreagenz WST-1 (Roche) verwendet. Das Messprinzip beruht auf der Umsetzung des Farbstoffs WST-1 (*water soluble Tetrazoliumsalt*) zu einem photometrisch erfaßbaren Formazan-Produkt. Da das Ausmaß dieser Reduktionsreaktion proportional zur Anzahl vitaler Zellen ist, ermöglicht diese Methode die Quantifizierung der Viabilität und Lebendzellzahl (zur Übersicht [279, 280]). Alle untersuchten Zelllinien wurden adhärent kultiviert, daher ermöglichte der Assay das Erstellen einer kontaktabhängigen Wachstumskinetik. Zur Durchführung wurden in eine 96-Well-Platte 500-1.000 Zellen je Well eingesät. Zu den jeweils gewünschten Zeitpunkten erfolgte ein Mediumswechsel mit WST-1-haltigem Kulturmedium (Verdünnung 1:11). Nach einer 30- bis 60-minütigen Inkubation im Brutschrank konnte in einem ELISA-Reader die Zellzahl durch Messung der A_{450} bestimmt werden. Zur Quantifizierung musste ein Hintergrundsignal, gemessen in einem zellfreien Well mit WST-Gemisch, subtrahiert werden. Zellzahlen wurden entweder direkt in Form der gemessenen A_{450} -Werte angegeben oder auf auf parallel behandelte Kontrollzellen normiert.

3.2.6.14 Bestimmung von Zytotoxizitäten und Erstellen von Dosis-Wirkungskurven

Zur Ermittlung der Chemosensitivität von Tumorzellen gegenüber Antitumormitteln wurde ein WST-Proliferationsassay durchgeführt. Dazu wurden in einer 96-Well-Platte 1.000-2.000 Zellen je Well eingesät und mindestens 24 h unter Standardbedingungen kultiviert (alle Ansätze in Triplikaten). Die Konzentrationseinstellung der Zytostatika erfolgte durch das Erstellen serieller Verdünnungsreihen in frischem Kulturmedium. Um gleiche Verteilungsmengen sowie identische Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurde in allen Wells ein Mediumswechsel durchgeführt. Nach den jeweiligen Behandlungszeiträumen (48-120h) erfolgte die Messung der Überlebensrate mittels WST-1 (siehe Abschnitt 3.2.6.13). Zum Normieren dienten unbehandelte Zellen unter auf denselben Platten (gleiche Wachstumsbedingungen) und deren WST-Absorptionswerte auf 100% gesetzt wurden. Die Ermittlung der IC_{50} -Werte erfolgte mit Hilfe von SigmaPlot (dynamisches *curve fitting* über die Hillslope-Regression [281]).

4 Ergebnisse

4.1 Serumabhängigkeit der FGF-BP Expression

Bei der im Zuge einzelner Experimente routinemäßig durchgeführten Quantifizierung der FGF-BP mRNA-Spiegel zeigte sich, dass die Proteinexpression stark abhängig von der Herkunft bzw. Menge des zugesetzten Serums war. Dieser Effekt konnte auf transkriptioneller Ebene für verschiedene Tumorzelllinien in mehreren, voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden. Entgegen den Beobachtungen von Harris *et al.* [155] sowie Beer *et al.* [163], bei welchen es zu einer serum-induzierten Zunahme der FGF-BP-Expression kam (bereits nach kurzen Stimulationszeiträumen von 6 - 10 h), wurde im Zuge dieser Arbeit bei den untersuchten Zellen ein Anstieg der FGF-BP mRNA unter andauernd serumfreien Bedingungen erhalten. Die Zunahme der Genexpression ergab sich mittels qRT-PCR-Analysen, bei welchen die FGF-BP-spezifischen C_T -Werte von zeitabhängig genommenen RNA-Proben bei mehreren Zelllinien nach Serumentzug um mehrere Zyklen hin zu früheren Zykluszahlen verschoben wurden, unabhängig von den konstant erhaltenen Signalen der Haushaltsgene (Abb. 5). Darüber hinaus reagierte die FGF-BP Genexpression äußerst sensibel bei einen Wechsel auf FCS eines anderen Herstellers (Abb. 6).

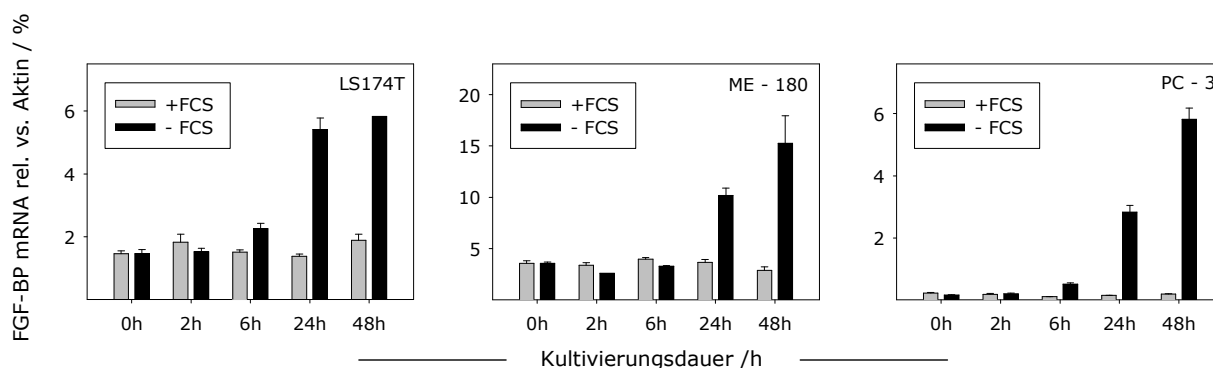


Abb. 5: FGF-BP-Expression bei serumfreier Kultivierung (qRT-PCR mit cDNAs verschiedener Tumorzellen). Gezeigt ist die FGF-BP-Expression in drei unterschiedlichen Tumorzelllinien, welche, mit zunehmender Kultivierungsdauer in serumfreiem Medium zeitabhängig ansteigt (rel. vs. Aktin \pm SD).

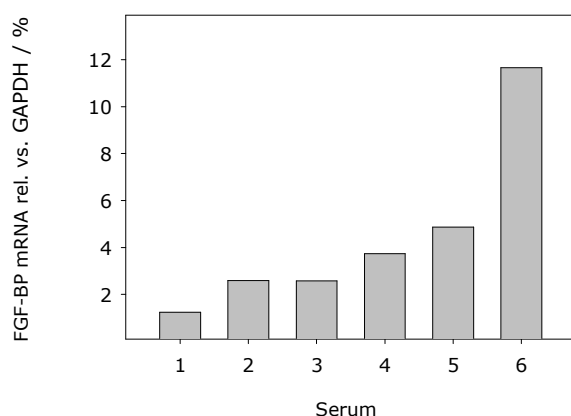


Abb. 6: Serumabhängigkeit der FGF-BP-Expression (qRT-PCR mit cDNA von LS174T). Gezeigt ist die serumabhängige FGF-BP-Expression von unter gleichen Bedingungen vorkultivierten wt-Zellen. 2h nach Einsaat erfolgte zum Entfernen restlicher Serumbestandteile ein zweimaliges Waschen mit PBS sowie eine einstündige serumfreie Vorbehandlung. Anschließend wurden die Zellen für 24 h in serumkomplementiertem Medium mit verschiedenen FCS unterschiedlicher Hersteller kultiviert (Endkonzentration 10%) und hinsichtlich FGF-BP-Expression untersucht. 1=PAA, 2=PAA-Gold, 3=Tet-approved FCS, Clontech, 4=Gibco, 5=Lonza, 6=serumfrei.

Da diese experimentellen Voraussetzungen das Etablieren einer reproduzierbaren FGF-BP-targeting Strategie äußerst schwierig gestalteten, wurde zu sämtlichen Versuchen ein Parallelexperiment unter identischen Bedingungen durchgeführt, um die der *knockdown*-Effizienz zu erfassen.

4.2 FGF-BP targeting-Strategien im Vergleich

4.2.1 siRNA-vermitteltes FGF-BP-targeting

In vitro-Untersuchungen mit den drei kommerziell erhaltenen siRNAs (von Ambion gelieferte Duplexe) ergaben, dass in LS174T-Zellen durch Doppeltransfektion der siRNAs im Abstand von 48 h Reduktionen der FGF-BP mRNA um maximal ~70% möglich sind (Abb. 7). Allerdings ließ sich innerhalb des bei siRNAs typischerweise gewählten Untersuchungszeitraums von 48 - 120 h kein nennenswerter *knockdown* auf Proteinebene detektieren (Western blot). Für Zellkulturexperimente wurde daher die Strategie einer stabilen FGF-BP-Depletion über shRNAs gewählt (siehe Abschnitt 4.2.2). Bei der *in vivo*-Studie (siehe Abschnitt 4.3.5) kam dennoch ein über siRNAs vermitteltes Gen-targeting zur Verwendung, da anzunehmen war, dass die mehrfach wiederholten Transfektionen der Nukleinsäurekomplexe während des ~4-wöchigen Behandlungszeitraums den transienten Charakter der siRNAs überdauert haben und dadurch auch mit siRNAs eine längerfristige Reduktion der FGF-BP-Menge in den Tumortransplantaten erreicht werden konnte.

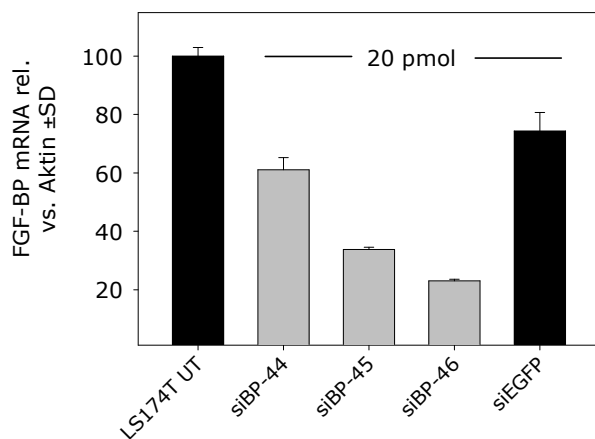


Abb. 7: RNAi-vermitteltes FGF-BP-targeting in LS174T mit synthetischen siRNAs (qRT-PCR).

Drei gegen FGF-BP gerichtete siRNAs (siBP44, siBP45, siBP46) erzielen *in vitro* unterschiedlich hohe targeting-Effizienzen. Die potenteste Sequenz (siBP46) führt zu einem ~70%igen knockdown und wurde daher bei einem *in vivo* FGF-BP-targeting eingesetzt (Doppeltransfektion mit INTERFERin von 20pmol siRNA je 6-Well, Analytik 72 h nach der zweiten Transfektion, UT=untreated, siEGFP zur Kontrolle).

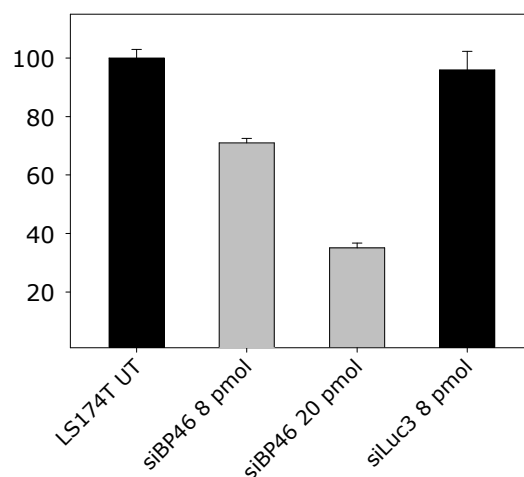


Abb. 8: Mengenabhängigkeit bei siRNA-Transfektionen (qRT-PCR).

Die Effizienz eines FGF-BP-knockdowns ist abhängig von der siRNA-Menge (Doppeltransfektion mit INTERFERin im 6-Well, Analytik 72 h nach der zweiten Transfektion, UT=untreated, siLuc3 als Kontrolle).

4.2.2 Stabiler FGF-BP-*knockdown* mit shRNAs und Regulierbarkeit durch das Tet-*on* System

Im Zuge dieser Arbeit wurden nach Transfektion der Tetracyclin-induzierbaren (Tet-*on*) shRNA-Expressionsvektoren insgesamt ~90 G418-resistente Tumorzellklone hinsichtlich einer erfolgreichen Plasmidintegration untersucht. In ~63% aller Ereignisse (59/93 der überlebenden Kolonien) führte die Antibiotika-Selektionierung auch zum stabilen Einbau der shRNA-Expressionskassette in das Genom. Um Klone mit gewünschten Eigenschaften (*i.e.* induzierbarer *knockdown*) zu ermitteln, wurden verschiedene Doxycyclin (Dox-) Mengen sowie unterschiedlich lange Induktionszeiträume getestet. Da die Kontamination von herkömmlichen FCS mit geringen Mengen an Dox nicht auszuschließen war³⁰, erfolgten alle Untersuchungen ebenfalls in speziellem Tet-*approved* FCS-haltigem Medium. Jedoch konnte bei der Zelllinie LS174T keine reproduzierbare Regulierbarkeit des Tetracyclin-sensitiven Promotors gezeigt werden, wenngleich zahlreiche Kandidaten mit einer permanenten Herunterregulation von FGF-BP unter den untersuchten klonalen Zelllinien aufzufinden waren (Abb. 14). Die für initiale Experimente vom Hersteller empfohlene Dox-Konzentration von 1 µg/ml wurde bis auf 1 ng/ml verringert, da eine Kultivierung der Zellen unter hohen Antibiotikakonzentrationen eine deutliche Proliferationshemmung sowie zytotoxische Effekte zur Folge hatte.

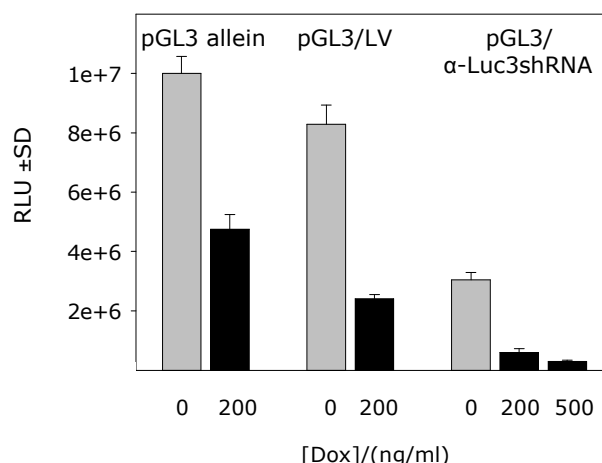
Um die Induzierbarkeit näher zu untersuchen, wurde das System anhand eines Reportergens validiert. Zu diesem Zweck kamen stabil Luciferase-exprimierende SKOV-3-Zellen (SKOV-3-10) zum Einsatz, welche mit einem Luc3-shRNA-Expressionsplasmid transient transfiziert und nachfolgend in einer Dox- sowie Zeit-abhängigkeit hinsichtlich der Luciferase-Expression untersucht wurden. Dabei war zwar bei massentransfizierten Zellen ein spezifischer shRNA-Effekt detektierbar (~50-70% verminderte RLU), jedoch war dies unabhängig von der zugesetzten Antibiotikamenge und ebenfalls in Abwesenheit von Dox meßbar (nicht gezeigt). Durch die transiente Kotransfektion eines Luciferase-Expressionsplasmids (pGL3) mit einer Luc3-shRNA wurde der gleiche Reportergen-Assay in dem gewünschten LS174T-Zellmodell wiederholt. Luciferase-Aktivitätsmessungen in LS174T bestätigten die fehlende Regulierbarkeit sowie eine durch Dox vermittelte Zytotoxizität (Abb. 9).

Das pSingletTs-System diene somit im Folgenden als Methode, um eine *stabile* vektorbasierte RNAi durchzuführen. Es wurden ~20 Klone hinsichtlich der Proteinexpression getestet, um Kandidaten zu erhalten, welche eine robuste FGF-BP-Depletion aufwiesen. Die weitere Kultivierung transfizierter Zellen in Tet-*approved* FCS war nicht notwendig, da der *knockdown* unabhängig von der Dox-Menge war.

30) Tetracycline werden als gängige Antibiotika in der Veterinärmedizin eingesetzt und sind placenta-gängig.

Abb. 9: Reporter-Gen-Assay zur Validierung des Tet-induzierbaren RNAi-Systems

LS174Twt wurden transient mit einem Luciferase-Expressionsplasmid bzw. mit pSingletTS (ohne shRNA=LV) resp. mit einer Luc3-shRNA kotransfiziert und 72 h später hinsichtlich Luciferase-Expression getestet (0,5 µg DNA pGL3 allein bzw. pGL3/LV zu jeweils 250 ng pro 24-Well). Die verminderten RLUs bei Dox-haltigen Ansätzen sind Folge einer geringeren Proliferationsrate von Luciferase-exprimierenden Zellen in Anwesenheit von Doxycyclin (Dox).



4.2.3 shRNA-Expressionsvektor verbleibt nach klonaler Selektionierung nicht stabil im Genom

Im Laufe der Untersuchungen mit den shRNA-exprimierenden Zellen fiel auf, dass mit steigender Anzahl an Subkultivierungen die Experimente mit klonalen, FGF-BP-depletierten Zelllinien schwer zu reproduzieren waren, insbesondere nach einer längeren Kultivierungsdauer. Die Analyse der genomischen DNA ergab, dass initial erfolgreich stabil transfizierte Zellen den RNAi-Vektor nicht dauerhaft im Genom behielten. Nach ~10-12 Passagen war die shRNA-Expressionskassette nicht mehr im Genom der Zellen aufzufinden, obwohl bei einer Nachselektionierung über G418 diese Zellen weiterhin über die Antibiotika-Resistenz verfügten. Stabil Leervektor-transfizierte Kontrollzellen verloren die shRNA-Plasmidbestandteile hingegen nicht (Abb. 10).

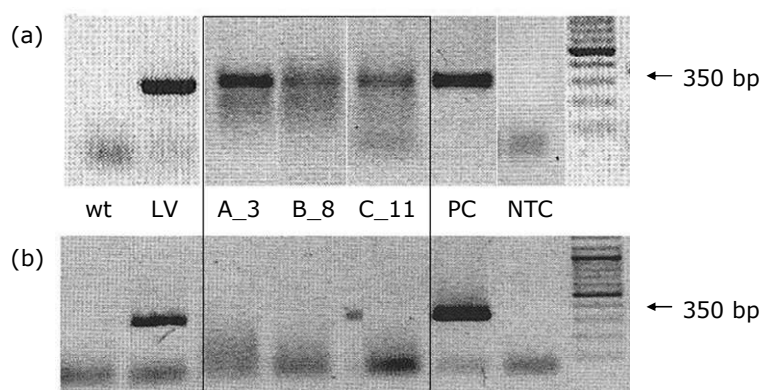


Abb. 10: Insert-PCR von gDNA zum Nachweis der shRNA-Expressionskassette.

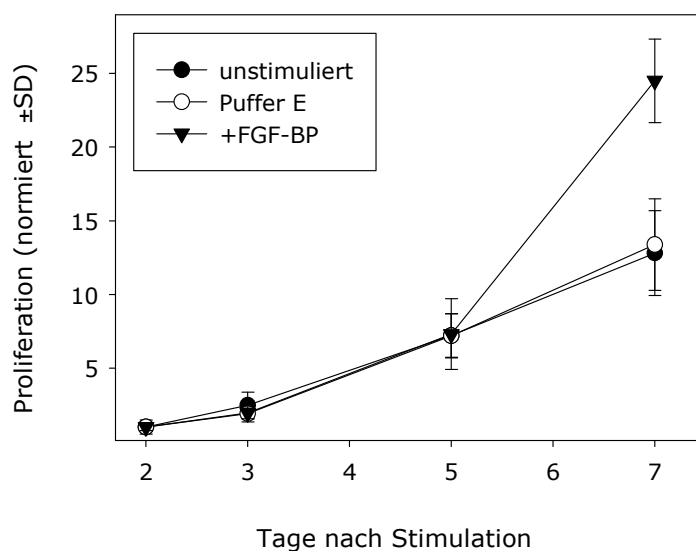
Stabil shRNA-transfizierte, klonale Zelllinien zu einem frühen Zeitpunkt nach der G418-Selektionierung (a) und nach ~10 Passagen (b). Nach ~2-monatiger Kultivierung ist in den FGF-BP-depletierten Klonen A_3, B_8, C_11 die shRNA-Expressionskassette nicht mehr auffindbar. Kontrollzellen (LV) haben die gen-modulierenden Plasmidbestandteile hingegen nicht verloren. PC=PCR-Positivkontrolle, NTC= no template control, PCR mit SingTetU6-Primern.

4.3 FGF-BP und Proliferation

4.3.1 Proliferationsfördernder Effekt von FGF-BP auf nicht-tumorigene COS-7-Zellen

Um den Effekt von FGF-BP auf nicht-tumorigene Zellen zu ermitteln, wurde die etablierte COS-7 Zelllinie als Modell gewählt, da sie natürlicherweise kein FGF-BP sowie FGF2 produziert und für Transfektionsexperimente gut geeignet ist, um biologische Untersuchungen mit Transgenen durchzuführen. Zu diesem Zweck wurde zum einen dem Kulturmedium rekombinantes Protein als exogener Stimulus zugesetzt³¹, zum anderen FGF-BP stabil überexprimiert. Beide Vorgehensweisen, heterologe Stimulation und endogene Überexpression, führten einheitlich zu einer gesteigerten Wachstumsrate bei der nativ FGF-BP-negativen Zelllinie (Abb. 11, Abb. 12). Die ermittelte proliferationsfördernde Wirkung von FGF-BP im adhäsionsabhängigen Wachstum im Monolayer steht damit im Widerspruch zu den Befunden von Abuharbeid und Hagenbusch mit stabil FGF-BP-exprimierenden Zellen im Soft-Agar-Assay [182, 282].

Abb. 11: Wachstumskinetik von COS-7 nach Stimulation mit Baculovirus-FGF-BP (WST-Assay).
Rekombinantes FGF-BP wurde unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und unmittelbar vor der Verwendung in PBS umgepuffert (1 µg/ml). Elutions-puffer E diente als Kontrolle und wurde gleichsam behandelt wie die Proteinprobe (normiert auf Tag 2 nach der Proteinzugabe \pm SD).



31) Untersuchungen vorhergehender Studien konnten zeigen, dass rekombinantes FGF-BP *in vitro* bioaktiv ist und zu einer dosisabhängigen Freisetzung von endogenem FGF2 führt [129].

4.3.2 Synergistischer Effekt von FGF2 bei Koexpression mit FGF-BP

Um den FGF-BP-vermittelten wachstumsstimulierenden Effekt in weiterführenden Experimenten in Abhängigkeit von dem wichtigen FGF-BP-Interaktionspartner FGF2 zu untersuchen, wurde mit doppelt-stabilen Zelllinien gearbeitet. Dazu kamen COS-7 Zellen zur Verwendung, welche entweder FGF-BP bzw. FGF2 alleine, oder beide Proteine koexprimierten. Da nicht auszuschließen war, dass bei der transgenen Expression mehrerer Fremdproteine unter Verwendung des starken viralen CMV-Promotors unspezifische zytotoxische Effekte auftreten [283-285], wurden (doppelt) Leervektor-Transfektanten (CMV) zur Kontrolle mitgeführt. Viabilitätsmessungen ergaben, dass die stabile Überexpression beider Gene auf nativ FGF-BP- sowie FGF2-negative COS-7-Zellen wachstumsfördernd wirkt. Bei der stabilen Koexpression war dabei ein synergistischer Effekt zu beobachten, so dass die höchste Proliferationsrate zu messen war, wenn beide Proteine in einer Zelllinie gemeinsam produziert wurden (Abb. 12).

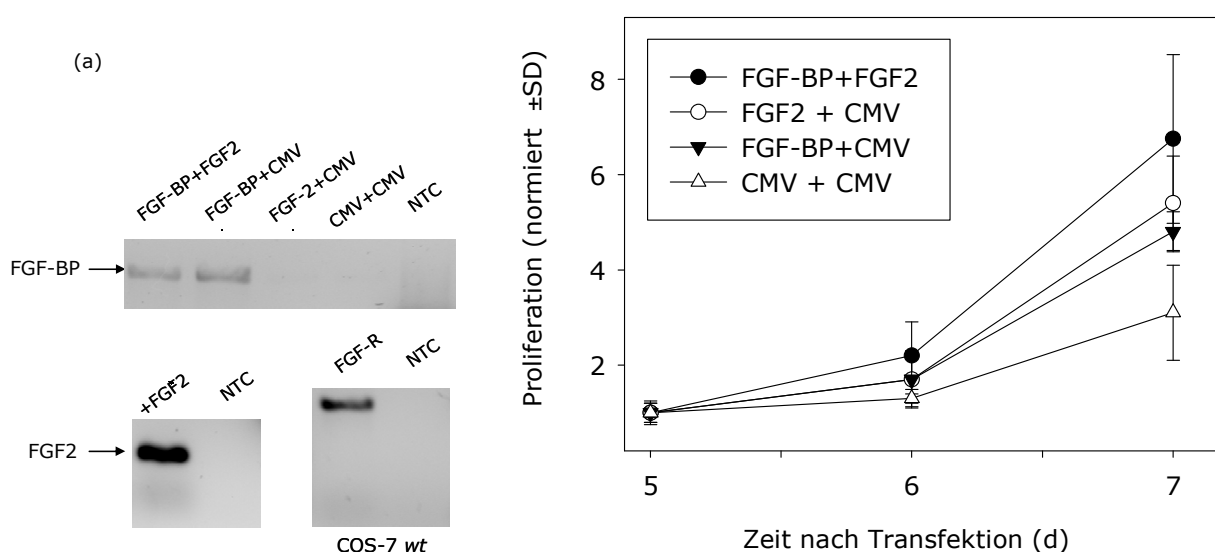


Abb. 12: WST-Proliferationsassay von COS-7-Zellen.

Die transgene Expression von FGF-BP sowie FGF2 fördert das kontaktabhängige Wachstum von COS-7-Zellen. Bei der Kostimulation durch FGF-BP mit FGF2 ist die Proliferationsrate der Zellen am höchsten. Als Kontrollen dienen doppelt stabile Leervektor-Transfektanten (CMV+CMV), normiert auf Tag 5 \pm SD.

(a) RT-PCR von stabil transfizierten COS-7 zum Nachweis der FGF-BP- sowie FGF2-Expression (bei FGF2 exemplarisch nur eine Zelllinie gezeigt). COS-7 wt sind FGFR -positiv (FGFR1), NTC=no template control.

(b) Affinitätsreinigung von FGF-BP aus stabilen COS-7 zum Nachweis der Genexpression (Western blot). Die Probenanreicherung erfolgte mittels Heparinsepharose aus dem konditioniertem Überstand der Zellkulturen. (Elution mit Hochsalzpuffern über einen NaCl-Gradienten: E1=0,5M NaCl, E2=1M NaCl, E3=1,5M NaCl, Anti-BP₁).

4.3.3 FGF-BP-*knockdown* wirkt antiproliferativ

Um die Frage zu untersuchen, in welchem Ausmaß FGF-BP regulierend in die Wachstumsgeschwindigkeit von Tumorzellen eingreift, wurden *knockdown*-Zelllinien mit unterschiedlich hohen Proteinspiegeln in Proliferationsassays miteinander verglichen. Dazu dienten LS174T-Kolonkarzinom- sowie ME-180-Zervixkarzinomzellen als Modell, da in beiden Zelllinien eine starke Überexpression von FGF-BP beschrieben ist [128, 147].

Bei den ME-180 kam ein etabliertes Ribozym-*targeting* zur Verwendung, um die stabile Herunterregulation von FGF-BP zu erreichen. In Abhängigkeit von der verbliebenen Proteinrestproduktion wurde ein antiproliferativer Gen-Dosis-Effekt beobachtet, bei welchem eine verminderte Wachstumskinetik linear mit der *knockdown*-Effizienz einzelner Klone einherging (Abb. 13).

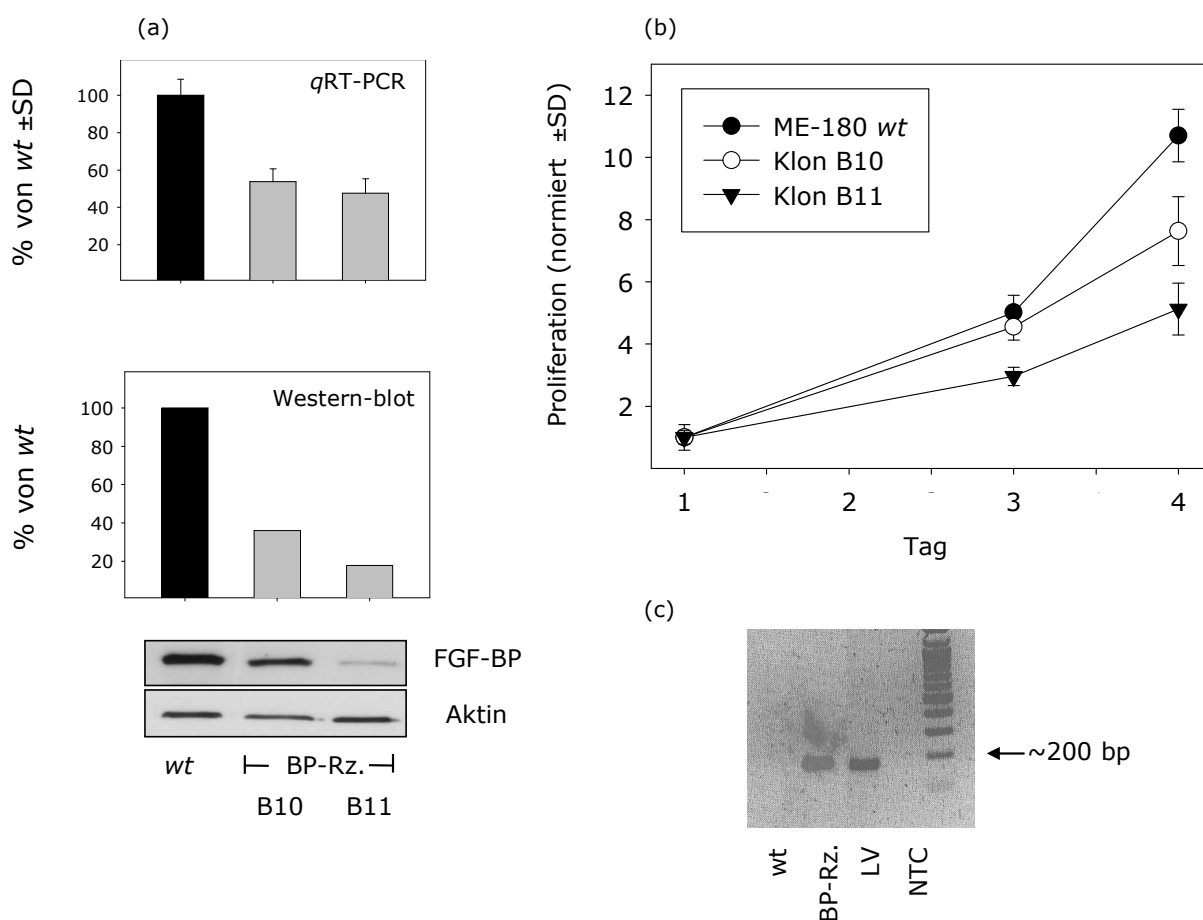


Abb. 13: FGF-BP-Ribozym-targeting in ME-180-Zellen.

(a) Die stabile Transfektion mit anschließender Selektionierung Ribozym-exprimierender Klone führt zu isogenen Zelllinien mit unterschiedlich hohem FGF-BP-knockdown. Die targeting-Effizienzen liegen bei ~50% auf mRNA (qRT-PCR) und >50% auf Proteinebene (Western blot) bei einzelnen Klonen (BP-Rz.=ein FGF-BP-Ribozym-exprimierender Klon, B10 bzw. B11).

(b) WST-Proliferationsassay. FGF-BP-depletierte Zellklone wachsen auf Plastik deutlich langsamer als parentale Zellen (normiert auf Tag 1 \pm SD). (c) PCR aus gDNA zum Nachweis der Ribozym-Expressions-kassette. LV=pRcCMV, PCR-Positivkontrolle, NTC= no template control, PCR mit T7/BGH-Primern.

Bei einem auf RNAi basierenden Gen-targeting wurde mit einer weiteren Methode gezeigt, dass durch Reduktion der FGF-BP-Konzentration ein wachstumshemmender Effekt auf Tumorzellen ausgeübt wird. Die stabile Gendepletion mittels shRNAs führte in LS174T-Zellen zu einer ~40-80%igen Verringerung der Proteinlevel in einzelnen Klonen (Abb. 14a). Im Soft-Agar bildeten diese Klone Kolonien aus, deren durchschnittliche Größe nur ~25% der parentaler Zellen betrug (Abb. 14c). Auch im WST-Assay wuchsen die Klone deutlich langsamer als wt- bzw. Kontrollzellen (Abb. 14b).

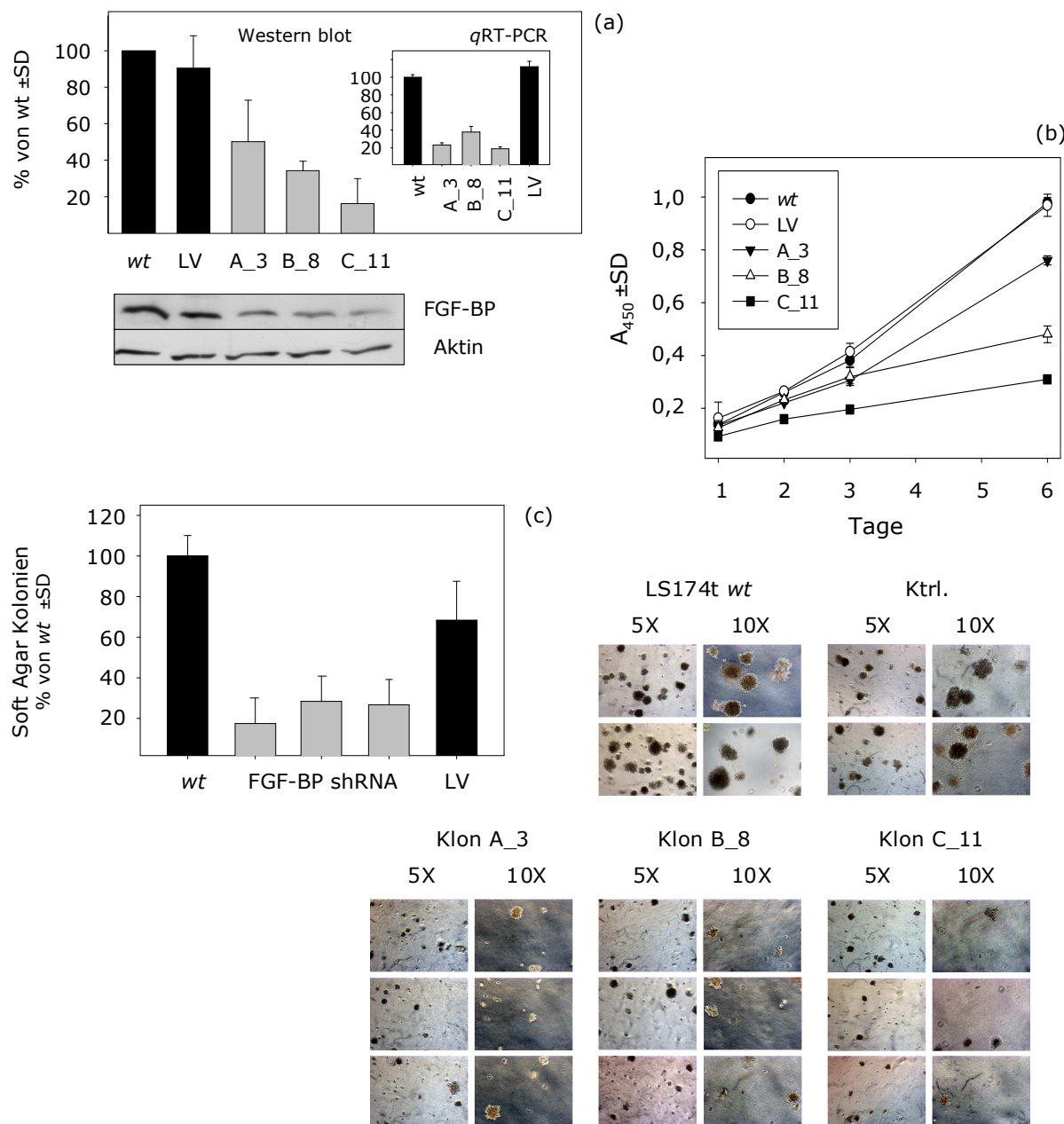


Abb. 14: shRNA-vermittelter FGF-BP-knockdown in LS174T.

(a) Die Effizienzen des shRNA-vermittelten FGF-BP-targetings liegen bei ~40-80% auf Proteinebene bzw. ~60-75% auf mRNA-Ebene bei einzelnen Klonen (rel. vs. Aktin). (b/c) Proliferationsassays. FGF-BP-depletierte Klone zeigen im adhäsionsabhängigen Wachstum im Monolayer (b) als auch im kontaktunabhängigen Soft Agar (c) deutlich langsamere Proliferationskinetiken als Wildtyp (wt) bzw. Kontrollzellen (LV), normiert, wt=100% ± SD, Kolonien >50µm).

4.3.4 FGF-BP-Depletion führt zu Alterationen im Zellzyklus

Ziel der durchgeführten FACS-Analysen war es zu ermitteln, ob und in welchem Ausmaß FGF-BP regulierend in den Zellzyklus eingreift. Dazu wurde die phasenspezifische Distribution (sog. Altersverteilung) von LS174T-Klonen mit konstitutivem FGF-BP-*knockdown* im Durchflußzytometer gemessen und mit Kontrollzellen verglichen. Bei der Propidiumiodid-Färbung ergab sich, dass Abweichungen in der FGF-BP-Expression zu Neuordnungen von Populationen im Zellzyklus führen. Nach *knockdown* waren die Zellen vermehrt in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus aufzufinden (Abb. 15). Der Phasenarrest war insbesondere nach einer vorherigen Synchronisation der Zellen durch die Verwendung des Spindelgifts Nocodazol ersichtlich. Da die für eine Vorbehandlung notwendige Nocodazolmenge zelllinienabhängig ist, musste diese zuvor in einer Konzentrationsabhängigkeit ermittelt werden (Abb. 16).

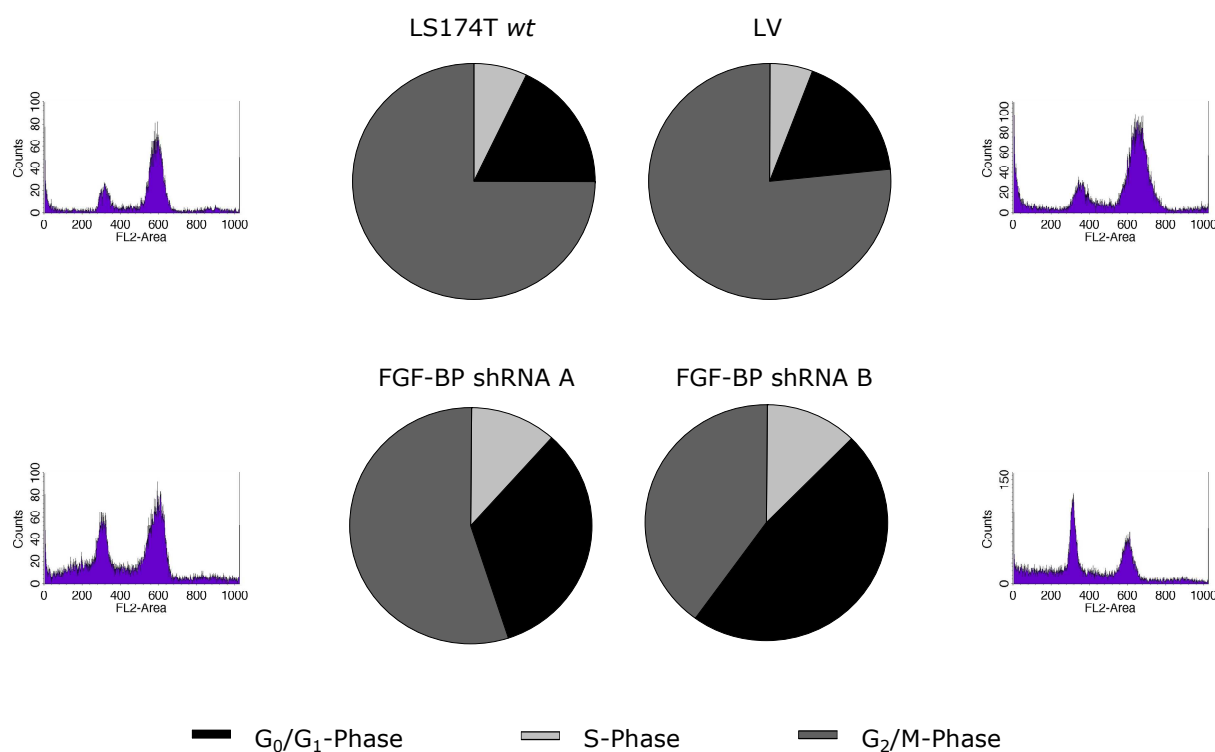


Abb. 15: FACS-Profil von LS174T-Zellen (Analyse der Altersverteilung).

Ein stabiler FGF-BP-*knockdown* führt zu einem G_0/G_1 -Arrest (Zellzyklusblockade in der G_1 -Phase). Der Unterschied zwischen FGF-BP-depletierten Klonen und parental Zellen bzw. der Kontrolle (LV) ist insbesondere gut differenzierbar nach einer forcierten G_2/M -Blockade (sog. *M-trapping*) mit anschließend fortgeführter Kultivierung von synchronisierten Zellkulturen. Es zeigt sich, dass nach einer 20h Nocodazol-Behandlung wt-Zellen und mock-Transfektanten bereits zu ~3/4 in der G_2/M -Phase akkumulieren, während FGF-BP-depletierte Zellen von dem Effekt des Prometaphasestoppers noch weitgehend unbeeinflusst bleiben und weiterhin dem natürlichen Verteilungsmuster nicht-vorbehandelter Zellen folgen. Histogramme an den Seitenrändern: Messung des DNA-Gehalts (FL2_{Area}) vs. zelluläre Ereignisse (Counts). Der erste Peak entspricht dem einfachen diploiden Chromosomensatz (2N) in der G_0/G_1 -Phase, der zweite Peak dem doppelten DNA-Gehalt (4N) in der G_2/M -Phase. Der Sub- G_1 -Bereich wurde bei der Quantifizierung nicht mit einbezogen, es ist aber aus dem Verteilungsmuster ersichtlich, dass *knockdown*-Zellen vermehrt „nicks“ sowie fragmentierte DNA enthalten, was auf eine erhöhte Apoptose-rate hindeutet (näheres dazu in Abschnitt 4.4).

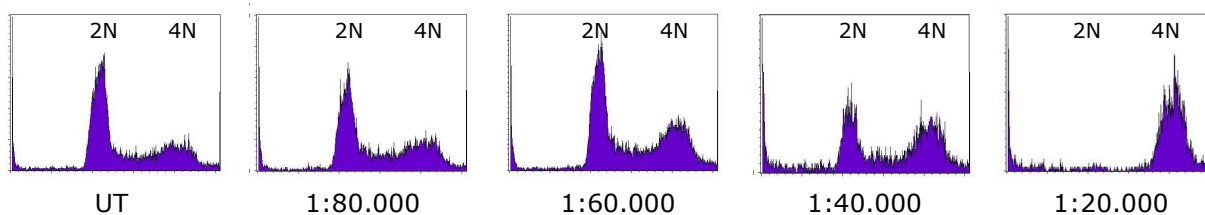


Abb. 16: Verdünnungsreihe zur Ermittlung einer effektiven Nocodazolkonzentration, um Zellkulturen zu synchronisieren (sog. *M-trapping*). Die Zellzyklus-arretierende Wirkung des Spindelgifts Nocodazol setzt erst ab einer bestimmten Verdünnungsstufe ein (hier 1:40.000). Bei 1:20.000 akkumulieren alle Zellen in der G₂/M-Phase. Ist die Nocodazolkonzentration hingegen zu hoch gewählt, sterben die Zellen ab. (Untersuchung an ME-180-Zellen, Nocodazol-Stocklösung in DMSO = 10mg/ml, UT=untreated, Behandlung ~20 h).

4.3.5 Antitumoraler Effekt eines FGF-BP-*knockdowns* im Nacktmausmodell

Um die biologischen Effekte einer FGF-BP-Depletion *in vivo* zu untersuchen, wurden LS174T-Kolonkarzinomzellen gewählt, da diese Zelllinie hochgradig tumorigen ist und FGF-BP stark überexprimiert [286-288]. Dabei konnte unter Verwendung einer PEI/siRNA-vermittelten *targeting*-Strategie bei den Tumoren in der mit spezifischer siRNA gegen FGF-BP (siBP46) behandelten Gruppe eine Reduktion der FGF-BP-Spiegel um ~30% erreicht werden (Western blot, Abb. 17). In der Behandlungsgruppe wurde ein antitumoraler Effekt hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit der Transplantate festgestellt (Abb. 18). Unterschiede in den Tumorgößen zwischen den drei Versuchsgruppen waren ab Tag 12 klar erkennbar. Im Durchschnitt wuchsen Tumore des unbehandelten Wildtyps sowie der Kontrollgruppe (Luc3-siRNA) schneller als Tumore in der mit siBP46 behandelten Gruppe. Aufgrund dieses schnelleren Wachstums fanden sich in den beiden Kontrollgruppen vermehrt Transplantate mit größeren Gewebse Nekrosen. Am Tag 24 *post Injektion* erreichte der Großteil aller Tumore eine kritische Größe, so dass die Studie beendet werden musste. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, erfolgte die Auswertung der Wachstumskinetiken nur unter Berücksichtigung der Tumore, deren initiale Größe (d.h. zum Zeitpunkt der ersten Applikation der PEI/siRNA-Komplexe) geringer als 100mm³ war. Größere Tumore wurden nicht mit einbezogen. Eine *in vivo*-Distributionsstudie mit [³²P]-markierten siRNAs konnte bestätigen, dass die Nukleinsäurekomplexe nach *i.p.*-Applikation den Tumor in ausreichender Menge erreichten³².

32) Freundlicherweise von Sabrina Höbel durchgeführt.

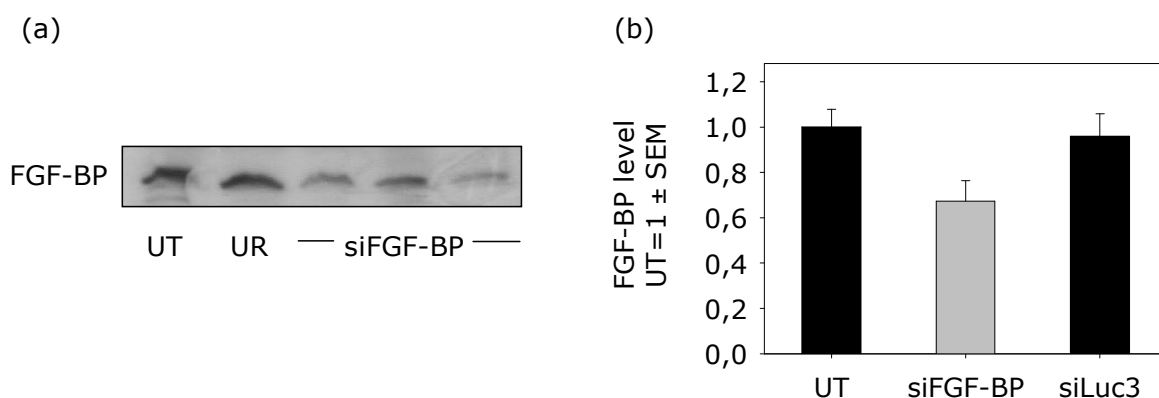


Abb. 17: FGF-BP-Expression von LS174T in vivo.

(a) repräsentativer Western blot eines PEI/siRNA vermittelten FGF-BP-targetings in LS174T-Xenotransplantaten. Der Immunoblot zeigt die FGF-BP-Expression dreier repräsentativer, mit spezifischen siRNAs behandelter Tumore. Exemplarisch ist zusätzlich jeweils ein Proteinnachweis aus der unbehandelten (UT-) sowie der Kontrollgruppe (siLuc3) gezeigt. Um gleiche Lademengen zu gewährleisten, wurden die Proben vor dem Blotten im Coomassie-gefärbten Gel semi-quantitativ miteinander verglichen und gegen einen Aktin-Antikörper inkubiert (nicht gezeigt). (b) Densiometrische Auswertung aller per Western blot untersuchten Tumore hinsichtlich der FGF-BP-spezifischen Immunbanden bei ~26 kDa (optische Dichte normiert auf die Aktin-Ladekontrolle, UT-Gruppe=1 ($n=17$, $n_{UT}=5$, $n_{siLuc3}=5$, $n_{siBP46}=7$)).

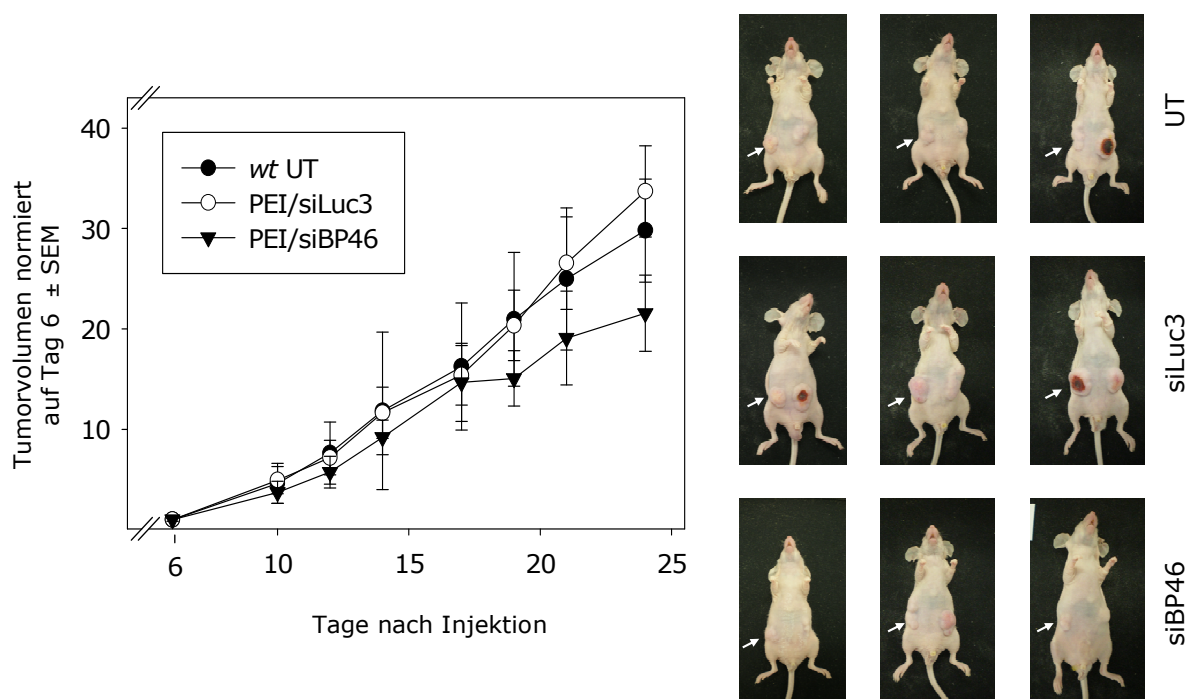


Abb. 18: In vivo-Wachstumscharakteristik von LS174T-Zellen.

Wachstum von s.c. LS174T-Tumorexotransplantaten nach einer i.p.-Applikation von PEI/siRNA-Komplexen. Wachstumskurven normiert auf Tag 6 post Injektion ±SEM ($n=17$, $n_{UT}=5$, $n_{siLuc3}=5$, $n_{siBP46}=7$, unter Berücksichtigung aller Tumore mit initial $<100\text{mm}^3$, wt UT=Gruppe ohne Behandlung, siLuc3=Kontroll-siRNA, Behandlungsbeginn Tag 6 post Injektion).

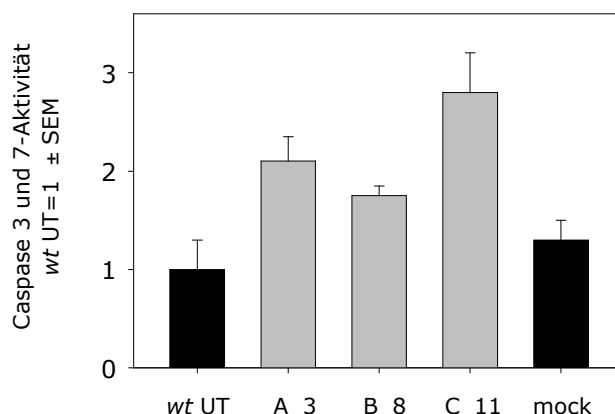
4.4 Anti-apoptotischer Effekt von FGF-BP

4.4.1 Apoptose-Induktion nach stabilem FGF-BP-*knockdown*

Die RNAi-vermittelte, stabile Herunterregulation von FGF-BP führte zu Veränderungen in der Apoptoserate von LS174T-Tumorzellen. Als Parameter zu deren Erfassung diente ein Lumineszenz-basierter Protease-Assay, welcher die enzymatischen Aktivitäten der Caspasen 3 und 7 erfaßte. Diese sog. Effektorcaspasen waren als Markerproteine geeignet, da sie durch sämtliche zelluläre Apoptose-mechanismen³³ aktiviert werden und als terminale Enzyme eine Schlüsselrolle bei der Exekution des programmierten Zelltods spielen.

Dabei war festzustellen, dass die intrinsische Aktivität dieser Caspasen in monoklonalen Zelllinien mit permanentem FGF-BP-*knockdown* erhöht war, verglichen zu unbehandelten *wt*-Zellen resp. *mock*-Transfektanten. Der daraus abgeleitete anti-apoptotische Effekt von FGF-BP ist in Abb. 19 gezeigt.

Abb. 19: FGF-BP beeinflusst die Aktivitäten der Effektorcaspasen 3 und 7. Nach stabilem FGF-BP-*knockdown* steigt die konstitutive Aktivität der pro-apoptotischen Proteasen bei FGF-BP-depletierten LS174T-Klonen (A_3, B_8, C_11) signifikant an. Die gemessenen Enzymaktivitäten sind in Form von relativen Lichteinheiten (RLU) dargestellt und auf die Zahl lebender Zellen normiert (RLU/A_{450} , $wt=1 \pm SEM$, $n=3$).



4.4.2 Apoptose-Rescue: stabile FGF-BP-Überexpression verringert Caspaseaktivität

Zur Bestätigung der in Abschnitt 4.4.1 ermittelten anti-apoptotischen Wirkung von FGF-BP wurde ein *Rescue*-Experiment mit FGF-BP-überexprimierenden Tumorzellen durchgeführt. Als Modell dienten nicht-tumorigene SW-13-Zellen, da sie zwar eine Reihe von FGFs, aber natürlicherweise kein FGF-BP exprimieren [152]. Die transgene FGF-BP-Expression führte dazu, dass die intrinsische Aktivität der Caspasen 3 und 7 in einem stabil FGF-BP-cDNA transfizierten Zellklon (HB-4) niedriger lag als in den Kontrollzellen (pRcCMV Leervektor) bzw. dem unbehandelten Wildtyp (*wt* UT, Abb. 20).

33) Einerseits über eine Caspase 8/10-abhängige Aktivierung (TNF/TRAIL/Fas-Ligand-Pathway, sog. extrinsischer Weg), andererseits über den Caspase 9-Weg (Stress-induzierte Freisetzung von Cytochrom c, syn. intrinsischer Weg, zur Übersicht [289, 290]).

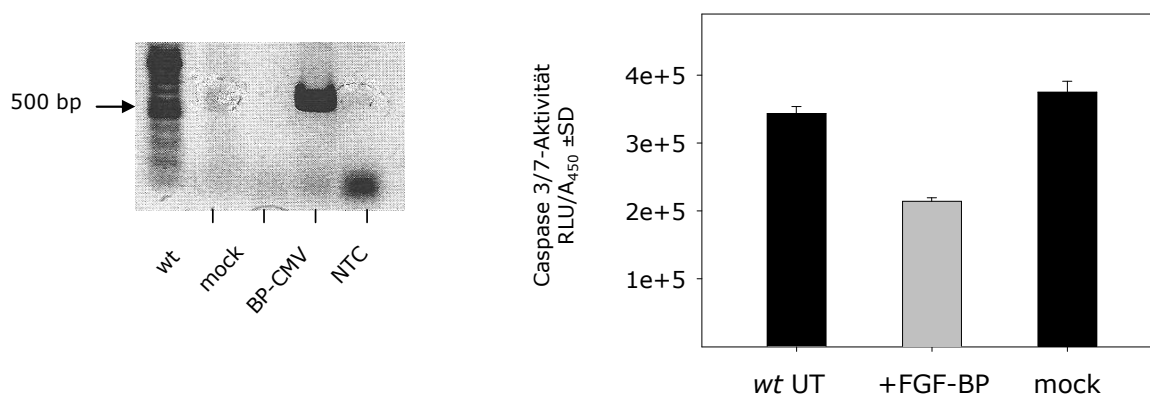


Abb. 20: Apoptose-Rescue durch FGF-BP-Überexpression in SW-13-Zellen (Caspase 3/7-Aktivitätstest). Rechts: Bei einer Überexpression von FGF-BP sinkt die basale Aktivität der Effektorcaspasen 3/7 in stabil-transfizierten SW-13. Der Apoptose-inhibierende Effekt war nur unter stabilen Bedingungen zu beobachten (Messung 48 h nach Einsaat, 10% FCS). Links: RT-PCR zum Nachweis der transgenen Expression (mock = pRcCMV, BP-CMV = full length FGF-BP-cDNA in pRcCMV (Klon HB-4), NTC = no template control, PCR mit FGF-BP-spezifischen Primern. Das Fehlen von template-DNA in der Negativkontrolle (NTC) führt zur Bildung einer „Primerwolke“, bestehend aus unspezifisch gebildeten PCR-Produkten bzw. Primerdimeren.

Um die Spezifität der Apoptose-inhibierenden Wirkung von FGF-BP in einer FGF-BP-positiven Zelllinie zu untersuchen, wurde das gleiche Experiment in nativ stark überexprimierenden LS174T wiederholt. Eine weitere, transiente FGF-BP-Überproduktion führte in LS174T auf transkriptioneller Ebene zwar zu einem drastischen Anstieg der Expressionsrate (qRT-PCR), jedoch ergaben Aktivitätsmessungen der Effektorcaspasen keinen spezifischen Effekt, da über den gesamten Zeitraum der forcierten Expression ebenfalls in Kontrollzellen die Apoptoserate stark erhöht war (Abb. 21).

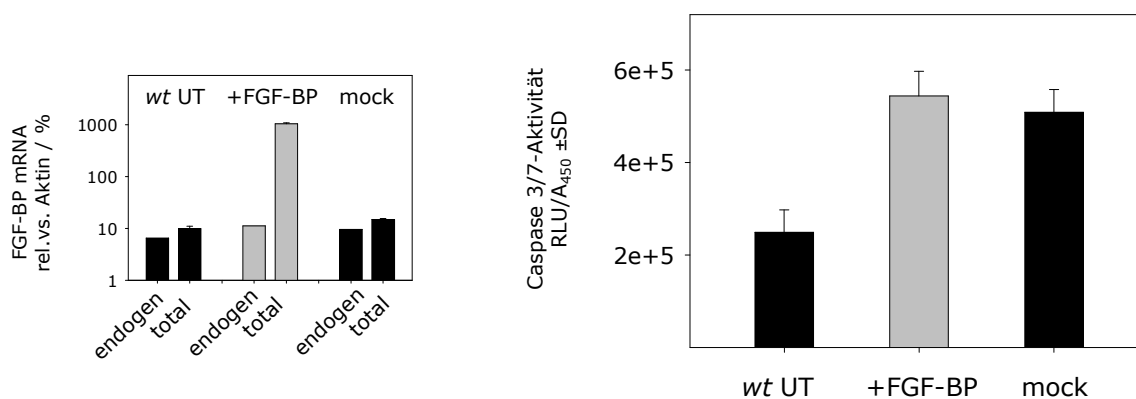


Abb. 21: Caspase 3/7-Aktivität in LS174T-Zellen bei transienter FGF-BP-Überexpression. Rechts: Eine forcierte Überexpression von FGF-BP wirkt sich nicht auf die basale Enzymaktivität der Effektorcaspasen 3/7 in den nativ FGF-BP hoch-produzierenden Zellen aus. Zytotoxische Effekte der Transfektion führen auch bei Kontrollzellen zu einem Anstieg in der Apoptoserate (Messung 72 h nach Transfektion, 2% FCS). Links: qRT-PCR zum Nachweis der FGF-BP-Überexpression. Endogene FGF-BP-Transkripte können unter Verwendung der in Abschnitt 3.1.4 genannten qRT-PCR-Primer quantifiziert werden. Diese erfassen jedoch nicht die zusätzliche vektorvermittelte Expression, da der 5'-Primer im nicht-translatierten Bereich (UTR) der revers transkribierten mRNA hybridisiert. Zur Amplifikation der totalen FGF-BP-Menge dienen genspezifische Primer, welche die FGF-BP coding sequence (CDS) erkennen. Beide Amplikons haben annähernd gleiche Länge sowie Basenzusammensetzung und wurden in einem gemeinsamen PCR-Lauf amplifiziert.

4.5 Identifizierung relevanter *Pathways* im FGF-BP-Signaling

4.5.1 FGF-BP-vermittelte Alterationen von MAP-Kinasen in der FGF-BP-Signaltransduktion

Um die Fragestellung zu adressieren, inwieweit eine Herunterregulation von FGF-BP Änderungen in Signaltransduktionswegen durch MAP-Kinasen (MAPK) hervorruft, wurde ein *Phospho*-MAPK-Screening durchgeführt. Der dazu verwendete, kommerziell erworbene Antibody-Array ermöglichte die simultane Bestimmung spezifischer Aktivierungszustände (Phosphorylierungsgrade) aller drei Hauptgruppen der MAPK ERK, JNK/SAPK und p38 (jeweils mit entsprechenden Isoformen) sowie weiterer Serin/Threonin-Kinasen. MAPKs spielen eine essentielle Rolle bei der Zellproliferation und Entwicklungsvorgängen (Differenzierung, Embryogenese) und sind maßgeblich an der neoplastischen Transformation sowie der Regulation apoptotischer Vorgänge beteiligt (zur Übersicht [291-293]). Um die FGF-BP-abhängigen Änderungen im Aktivierungsstatus der *target*-Moleküle zu ermitteln, kam ein stabil shRNA-exprimierender LS174T-Klon zur Verwendung. Als Kontrollzellen dienten stabile Leervektor-Transfektanten (Abb. 22).

Es wurde beobachtet, dass der FGF-BP-depletierte Phänotyp im Vergleich zu den parentalen Zellen Veränderungen im Akt/PKB-Signalweg aufwies. Unter *knockdown*-Bedingungen waren zwei der für das zelluläre Überleben wichtige Akt-Isoformen stärker deaktiviert als in den Kontrollzellen (*i.e.* *Phospho*-Akt1/2, syn. PKB α/β). Auch das *Phospho*-Akt pan -Signal war in herunterregulierten Zellen schwächer. Parallel dazu wurde in der klonalen Zelllinie eine erhöhte Konzentration an GSK3 β (Glykogen Synthase Kinase 3 β) gemessen³⁴.

Bei den MAPK ERK 1/2 (syn. p42/44) sowie p38 wurden unter diesen experimentellen Bedingungen keine Unterschiede zwischen *knockdown*-Phänotyp und Kontrollzellen gesehen. Desweiteren blieb der Stress-induzierte SAPK/JNK-Weg nach der Herunterregulation unverändert, allerdings nur bei Quantifizierung der Isoformen von JNK 1/2/3 im Einzelnen³⁵, bei dem durch JNK pan vermittelten Signal hingegen entwickelte sich interessanterweise in dem FGF-BP-depletierten Zellklon ein um den Faktor ~3 stärkeres Signal.

34) Das durch GSK3 α/β -vermittelte Signal war von den *mock*-Transfektanten hingegen nicht unterscheidbar.

35) JNK1/2 sind ubiquitär exprimiert, JNK3 hingegen kommt ausschließlich im Gehirn, Herz sowie den Hoden vor. Die Stärke der JNK3-Signale lag daher auch nur auf dem Niveau der Negativkontrollen des Antibody-Arrays.

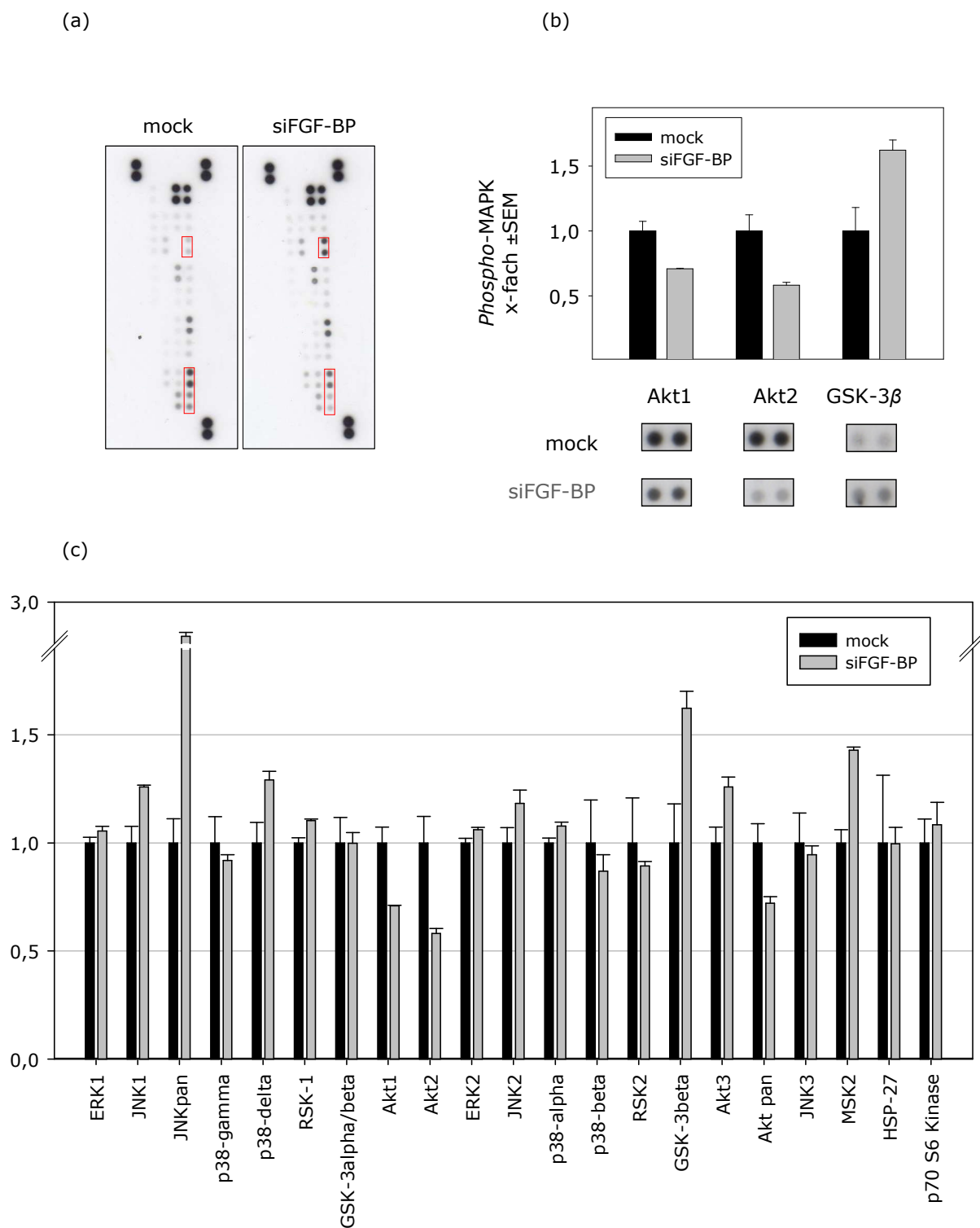


Abb. 22: Phospho-MAPK-Antibody-Array von LS174T-Zellen mit stabilem FGF-BP-knockdown. Quantifizierung der Phosphorylierungsgrade verschiedener MAP-Kinasen in LS174T mit stabilem FGF-BP-knockdown. (a) Repräsentative Exposition zweier Arrays von Probe- und Kontrollzellen (Verwendung gleicher Ausgangsmengen, à 300µg Proteinlysate). (b/c) Densitometrische Auswertung von 4 unterschiedlichen Filmexpositionen (normiert auf Kontrollzellen ±SEM). Durch Variieren der Entwicklungsdauer wurde berücksichtigt, dass bei unterschiedlich starken Signalintensitäten die Signalerfassung unterhalb der Filmsättigungsgrenze erfolgte.

4.5.2 FGF-BP abhängige Modulation von Apoptosemarkern und Zellzyklusregulatoren

Um die Folgen einer FGF-BP-Depletion hinsichtlich der ermittelten Veränderungen im Apoptosemuster sowie Alterationen im Zellzyklus auf molekularer Ebene näher zu untersuchen, wurde analog zu Abschnitt 4.5.1 ein Antibody-Array durchgeführt. Der Array erfaßte neben zentralen Apoptose- sowie Zellzyklus-assoziierten Markern ebenfalls Proteine, welche an der Homöostase des Redox-Haushalts der Zelle beteiligt sind. Dazu diente ein stabil shRNA-transfizierter LS174T-Zellklon. Als Kontrollzellen dienten stabile Leervektor-Transfektanten.

In Einklang zu den gewonnenen Daten bei den Apoptose-Assays (Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität unter *knockdown*-Bedingungen, siehe Abschnitt 4.4.1) wurde bei FGF-BP-depletierten Zellen eine erhöhte Konzentration an den pro-apoptotischen *BH3-only-domain* Proteinen Bad und Bax gefunden³⁶. Die TRAIL-Todesrezeptoren DR4 und DR5 waren in *knockdown*-Zellen um den Faktor ~1,4 verstärkt aktiviert (Abb. 23). In Übereinstimmung zu den ermittelten Daten zur Phasendistribution (siehe Abschnitt 4.3.4) zeigte sich bei der klonalen Zelllinie eine erhöhte Konzentration an aktiviertem p21^{WAF1/CIP1} (=p21, syn. CDKI-1, Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen 1) um den Faktor ~2. Der Anstieg dieses Zellzyklusprogressors korreliert mit dem Phasenarrest von Zellen unter *knockdown*-Bedingungen.

Darüber hinaus war die FGF-BP-Reduktion assoziiert mit Veränderungen im Aktivierungsmuster von O₂-abhängigen Regulatorproteinen, welche im Redoxstatus der Zelle eine wichtige Rolle spielen. Der unter anaeroben Wachstumsbedingungen hochregulierte Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor 1) war in *knockdown*-Zellen verstärkt vorhanden (Quantifizierung der unter normoxischen Bedingungen labilen α -Untereinheit), das bei Abbaureaktionen von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) essentielle Enzym Katalase fand sich in klonalen Zellen hingegen in geringerer Menge. Dies deutet auf eine Dysbalance in der oxidativen Verwertung sowie Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies bei den FGF-BP-regulierten Zellen hin.

36) Jedoch ergab der Array hierbei zwischen Zellklon und Kontrolle keinen Unterschied in der Menge an *cleaved(CI)*-Caspase-3. Bei der Erfassung der *pro*-Form zeigte sich im Zellklon sogar eine nicht-signifikante geringere Konzentration an Caspase 3. Die Caspase-7 konnte mit Hilfe dieses Arrays nicht bestimmt werden.

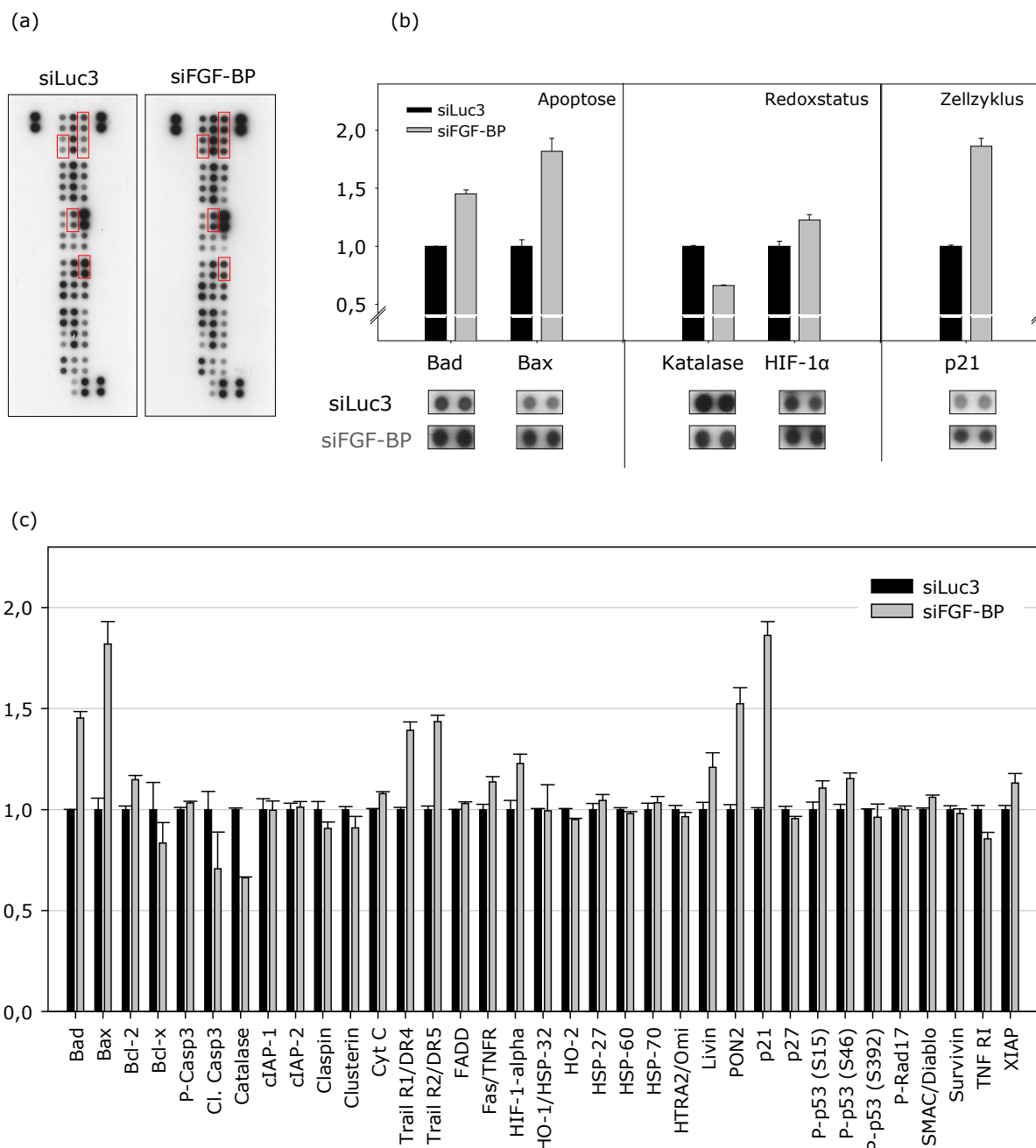


Abb. 23: Apoptose-Array von LS174T-Zellen mit stabilem FGF-BP-knockdown.

Detaillierte Analyse zur Quantifizierung zellulärer Konzentration bzw. Aktivierungsgraden von Apoptose- sowie Zellzyklus-assoziierten Markerproteinen in LS174T-Zellen mit stabilem FGF-BP-knockdown. (a) Repräsentative Exposition zweier Arrays von Probe- und Kontrollzellen (Verwendung gleicher Ausgangsmengen, je 500 μ g Proteinlysate). (b/c) Densitometrische Auswertung von 4 unterschiedlichen Filmexpositionen (normiert auf Kontrollzellen \pm SEM). Durch Variieren der Entwicklungsdauer wurde berücksichtigt, dass bei unterschiedlich starken Peroxidase-Reaktionen die Signalerfassung stets unterhalb der Filmsättigungsgrenze erfolgte. Eine weitere Normierung der Signale war für die Quantifizierung nicht erforderlich, da über die Auswertung der Positivkontrollen (Spots an den Rändern der Arrays) sowie Western blots aus denselben Lysaten gewährleistet wurde, dass beide Probeansätze äquivalente Proteinmengen enthielten.

4.6 Einfluß der FGF-BP-Expression auf die Sensitivität gegenüber Zytostatika

Die in Abschnitt 4.3.4 untersuchten Fragestellungen ergaben, dass FGF-BP an der Modulation von Zellzyklus- und Apoptose-relevanten Proteinen beteiligt ist. Darüber hinaus zeigten Tumorzelllinien mit konstitutivem FGF-BP-*knockdown* eine geringere Proliferationskinetik als die jeweiligen parental Zellen. Um die Frage nach einem sich daraus abzuleitenden möglichen Nutzen in der Tumorthherapie zu adressieren, dienten verschiedene isogene ME-180 Zelllinien mit reduzierten FGF-BP-Gehalt (stabil Ribozym-transfiziert, siehe Abschnitt 3.2.6.7) im Folgenden als Modell, um Chemosensitivitäten in einer FGF-BP-Abhängigkeit zu untersuchen. Die Einteilung der verwendeten Zytostatika in die zwei Hauptgruppen „Zellzyklus-abhängig“ und „Zellzyklus-unabhängig“ erfolgte unter Berücksichtigung des hauptsächlichen Wirkmechanismus und wurde der Verständlichkeit halber durchgeführt, um potentiell synergistische Ansatzpunkte einer Chemotherapie in Kombination mit einem FGF-BP-*targeting* erkennbar zu machen. So erreichen die letztgenannten Zytostatika ihr *target* nicht zwangsläufig Zellzyklus-unabhängig, der Wirkmechanismus ist jedoch weitgehend entkoppelt vom jeweiligen proliferativen Stadium, in welchem sich die betroffene Zelle zum Zeitpunkt der Applikation gerade befindet, so dass es zu einer nahezu phasenunspezifischen Hemmung durch diese Therapeutika kommt. Der Vollständigkeit halber wird erwähnt, dass Zytostatika zumeist nur auf sich teilendes Gewebe wirken, d.h. in der G₀-Phase ruhende Zellen sind für eine Chemotherapie nahezu unempfindlich. Alle Experimente wurden in serumkomplementiertem Medium (10% FCS) mit nicht-synchronisierten Zellen durchgeführt. Als Kontrollzellen dienten stabile pRcCMV-Leervektor-Transfektanten. Die *mock*-Transfektion wirkte sich nicht negativ hinsichtlich des Proliferationsverhaltens auf die Zellen aus.

4.6.1 Zellzyklus-abhängige Chemotherapeutika

Die nachfolgend eingesetzten niedermolekularen Wirkstoffe deckten mit jeweils ein bis zwei relevanten Vertretern alle Hauptklassen zugelassener Tumortherapeutika ab, welche bei CRC eingesetzt werden und deren zytotoxische Wirkung stark an bestimmte Phasen des Zellzyklus gekoppelt ist. Aus der Gruppe der Spindelgifte wurden Docetaxel und Vinorelbin gewählt, als Antimetabolit kam das Nukleosid-Analogon 5-Fluorouracil (5-FU) zur Verwendung. Irinotecan diente als Wirkstoff, um die Stoffklasse der Topoisomerasehemmer (Topo I-Inhibitoren) zu untersuchen.

In Einklang zu den Daten bei der Altersverteilung, bei welchen FGF-BP-depletierte Zellen sich vermehrt in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus aufhielten (siehe Abschnitt 4.3.4), waren asynchrone Zellen nach der FGF-BP-Herunterregulation gegenüber Chemotherapeutika, die spezifisch in der G₂/M-Phase wirken, weniger empfindlich. So zeigten die Ribozym-exprimierenden Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber Docetaxel sowie dem Vinca-Alkaloid. (Abb. 24a/b). Bei der Behandlung mit Docetaxel war

dieser Effekt besonders stark ausgeprägt, wenn man die minimale proliferationsinhibierende Konzentration als Vergleichsgröße heranzieht. Bei *knockdown*-Zellen waren die zytotoxischen Einflüsse des Spindelgifts erstmals bei einer ~10-fach höheren Dosierung durch WST meßbar, im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 24a). Bemerkenswert war ferner die hohe Restresistenz von FGF-BP-depletierten Zellen gegenüber Vinorelbin. Selbst bei einer Dosisescalation von ~2 Log-Stufen über die IC_{95} hinaus führte das Chemotherapeutikum nicht zum Absterben der Zellen (Abb. 24b). Bei der Behandlung mit dem Antimetaboliten 5-FU reagierten die Klone ebenfalls weniger sensitiv auf den falschen Nukleosidbaustein als parentale Zellen. Die Viabilität der *knockdown*-Zellen war nach Behandlung mit dem Antitumormittels im Bereich der mittleren inhibitorische Konzentration (IC_{50}) gegenüber dem Wildtyp um ~50% erhöht (Abb. 24c).

Im Gegensatz zu den o.g. Wirkstoffen hatte der FGF-BP-*knockdown* eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Irinotecan zur Folge. In Ribozym-exprimierenden Zellen wurde die Dosis-Wirkungskurve drastisch nach links verschoben. Die IC_{50} -Werte von *knockdown*-Zellen lagen im Vergleich zu den Kontrollen um den Faktor ~5 bei niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen (Abb. 24d).

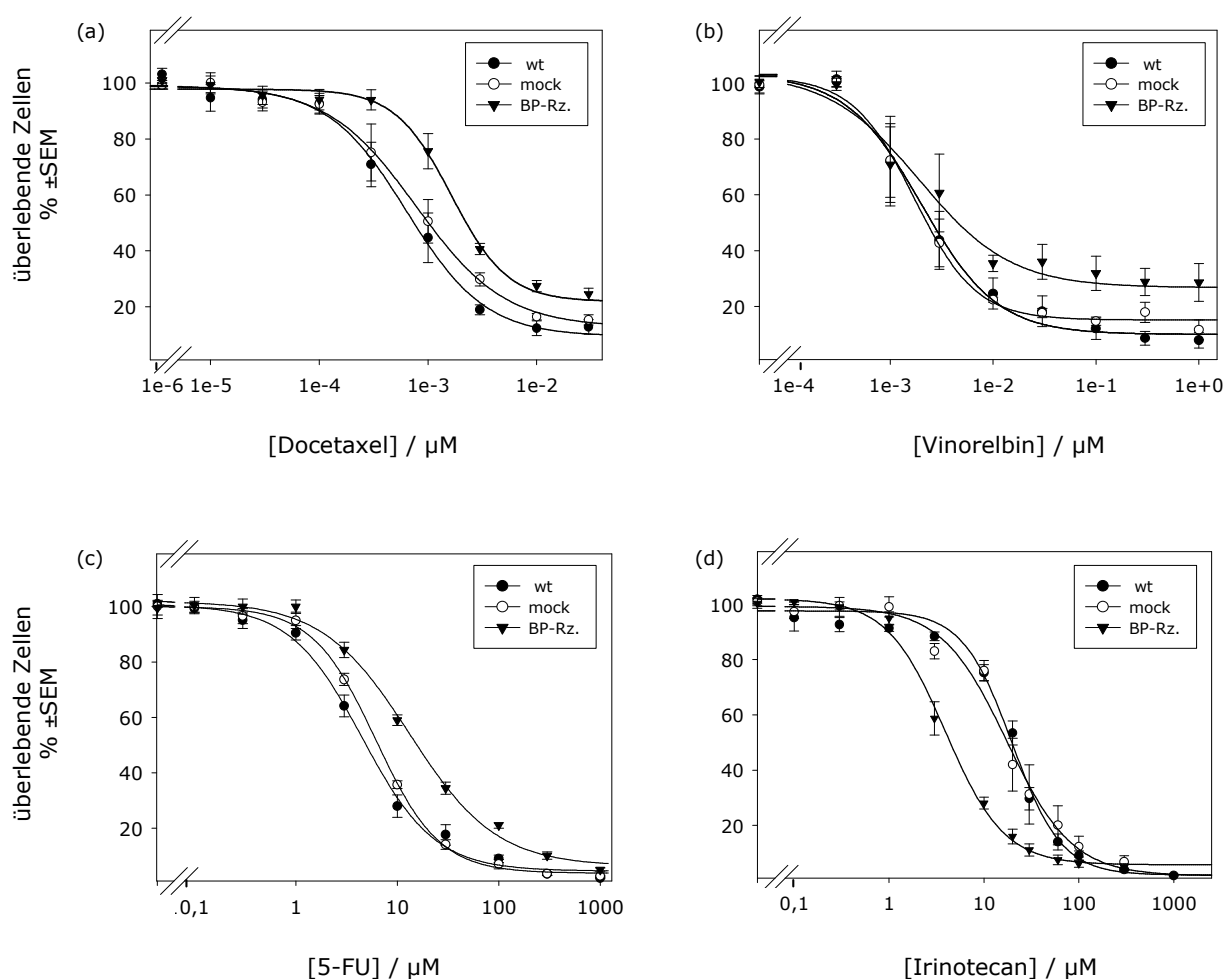


Abb. 24: Chemosensitivität FGF-BP-depletierter ME-180 gegenüber Zellzyklus-abhängigen Zytostatika.
Text siehe nächste Seite.

Text zu Abb. 24: Ein stabiler FGF-BP-knockdown macht Tumorzellen resistenter gegenüber den Spindelgiften Docetaxel (a) und Vinorelbin (b). Die Chemosensitivität für das Nukleosidanalogen 5-FU ist ebenfalls erniedrigt (c). Die durch den Topoisomerasehemmer Irinotecan verursachte Zytotoxizität ist nach FGF-BP-knockdown hingegen deutlich verstärkt (d). Beachtenswert ist die hohe Restresistenz FGF-BP-depletierter Zellen gegenüber einer Vinorelbin-Behandlung. Eine Dosisescalation von >2 Log-Stufen führt selbst bei sehr hohen Zytostatikakonzentrationen nicht zum Absterben der Zellen. (BP-Rz. = Ein FGF-BP-Ribozym-exprimierender Klon, B10 oder B11 (normierte Überlebensrate von 3 - 6 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten \pm SEM. Messung mit nicht-synchronisierten Zellen, Details zu den IC_{50} -Werten sowie Behandlungszeiträumen siehe nachstehende Tabelle).

4.6.2 Zellzyklus-unabhängige Chemotherapeutika

Um die Zytotoxizität einer Chemotherapie von FGF-BP-depletierten Zellen mit Wirkstoffen zu untersuchen, deren molekularer Angriffspunkt vom proliferativen Stadium der Tumorzelle weitgehend unabhängig ist, wurden die Interkalantien Oxaliplatin und Epirubicin ausgewählt³⁷. Proliferationsassays ergaben, dass eine Verminderung in der FGF-BP-Menge keinen Einfluß auf die Sensitivität gegenüber diesen Wirkstoffen ausübt. Die Dosis-Wirkungskurven aller untersuchten Zelllinien liefen allesamt parallel. Damit ist die Zytotoxizität dieser Chemotherapeutika unabhängig von der FGF-BP-Expression (Abb. 25a/b).

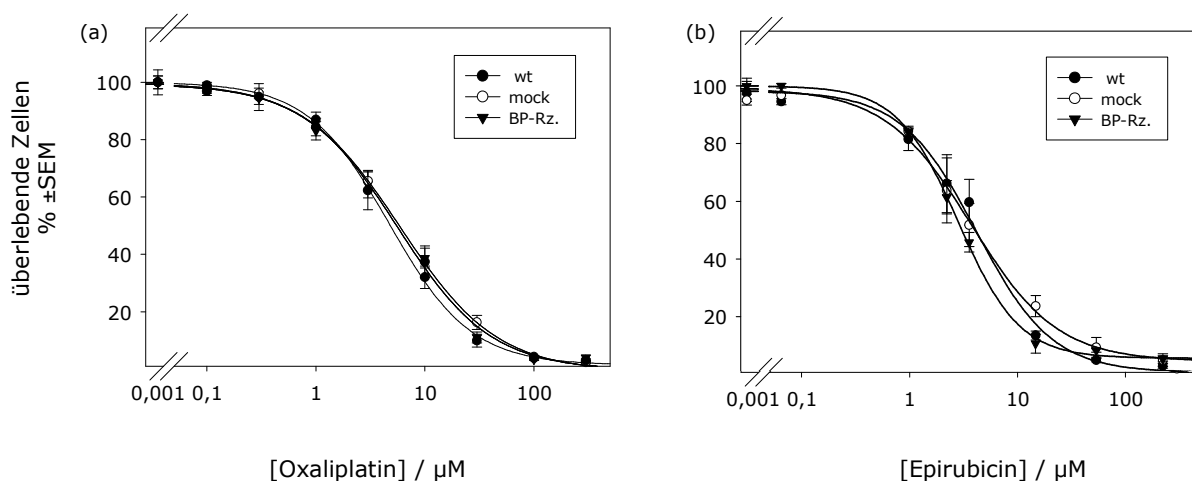


Abb. 25: Chemosensitivität von FGF-BP-depletierten ME-180 gegenüber Interkalantien und Quervernetzern. Ein stabiler FGF-BP-knockdown übt keinen Einfluß auf die Ansprechrate gegenüber Zytostatika aus, deren Wirkmechanismus vom Zellzyklus unabhängig ist. Die Dosis-Wirkungskurven einer Behandlung mit Oxaliplatin (a) sowie Epirubicin (b) verlaufen bei allen Zelllinien deckungsgleich (normierte Überlebensrate von 3-6 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten \pm SEM. Messung mit nicht-synchronisierten Zellen, Details zu den IC_{50} -Werten sowie Behandlungszeiträumen siehe nachstehende Tabelle).

37) Die Quervernetzung der DNA findet bei diesen Zytostatika zwar in jeder Phase des Zellzyklus statt, jedoch entfalten beide Wirkstoffe ihre maximale Zytotoxizität in der G₂- und S-Phase.

Übersicht über die untersuchten Zytostatika und deren Wirkung auf nicht-synchronisierte, FGF-BP-depletierte ME-180-Zervixkarzinomzellen.

Zytostatikum (Wirkstoffklasse)	Wirkmechanismus	Zytotoxizität spezifisch für	Effekt der FGF-BP-Depletion
Spindelgifte	Zellzyklusarrest/Apoptose		
• Docetaxel (Taxan)	Inhibition d. Chromatidentrennung, Tubulinstabilisierend	G ₂ /M-Phase	Sensitivität ↓
• Vinorelbin (Vinca-Alkaloid)	Synthesehemmung der Kernspindel, Tubulindestruierend		
Antimetabolite	Apoptose (p53-abhängig)		
• 5-FU (Pyrimidinanalogon)	Kompetitive Hemmung der DNA-/RNA-Synthese Hemmung der TK	S-Phase	Sensitivität ↓
Topoisomerasehemmer	Apoptose (p53-abhängig)		
• Irinotecan (Prodrug, aktiver Metabolit=SN-38)	Irreversible Strangbrüche Inhibition der Replikation	S-Phase	Sensitivität ↑
DNA-Quervernetzer	Interkalation/crosslinking		
• Oxaliplatin (Platinkomplex)	sterische Behinderung der RNA-Polymerase	alle Phasen	kein Effekt
• Epirubicin (Anthracyclinantibiotikum)	Ausbildung von Inter-/Intra-Strang-Addukten		

Spindelgifte, Antimetabolite sowie Topoisomerasehemmer besitzen einen phasenangepassten Angriff. DNA-Quervernetzer wirken hingegen in allen Abschnitten des Zellzyklus, TK=Thymidinkinase.

IC₅₀-Werte der untersuchten Zytostatika bei verschiedenen isogenen ME-180-Zelllinien.

Zytostatikum	IC ₅₀ wt μM (±SEM)	IC ₅₀ mock μM (±SEM)	IC ₅₀ BP-Rz. μM (±SEM)	Messung der Zytotoxizität nach
• Docetaxel	6E-4 (±8E-5)	8E-4 (±6E-5)	16E-4 (±2E-4)	96 – 120 h
• Vinorelbin	Restresistenz auch bei Dosisescalation, daher IC ₅₀ per Regression nicht ermittelbar			120 h
• 5-FU	5,5 (±0,5)	6,2 (±0,3)	13,1 (±1,7)	68 - 120 h
• Irinotecan	22,1 (±2,0)	21,0 (±2,1)	4,7 (±0,2)	48 – 96 h
• Oxaliplatin	5,8 (±0,6)	4,7 (±0,2)	5,6 (±0,6)	68 - 120 h
• Epirubicin	0,34 (±0,05)	0,31 (±0,03)	0,25 (±0,07)	48 -96 h

Die angegebenen IC₅₀ stellen Mittelwerte von 3-6 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten dar (in μM ± SEM), mock=pRcCMV-Leervektor Transformanten, BP-Rz.= Ein FGF-BP-Ribozym-exprimierender Klon, B10 oder B11.

4.7 Etablierung der FGF-BP Expression und Optimierungsstrategien in verschiedenen Wirtsorganismen

Da bei vorausgegangenen Untersuchungen zur rekombinanten Produktion von FGF-BP stets das Problem einer schlechten Expression auftrat (Aigner, unveröffentlichte Daten), wurde im Zuge dieser Arbeit schwerpunktmäßig analysiert, unter welchen Bedingungen das erhaltene Protein stabilisiert und damit die Ausbeute an FGF-BP erhöht werden kann. Dazu wurde parallel in mehreren Wirtsorganismen gearbeitet. Die Herstellungs- sowie Reinigungsverfahren von FGF-BP in Insektenzellen mit Hilfe des BAC-TO-BAC Baculovirussystems waren im Labor bereits etabliert und führten zur Bildung eines nicht-glykosylierten, acetylierten Proteins (*Bv*-FGF-BP), welches bei ~34 kDa im Western blot eine Immunreaktion zeigte (Abb. 28). *E. coli* FGF-BP erschien ebenfalls bei ~34 kDa. Das sekretierte *full length* Protein aus *P. pastoris* hingegen ergab im Western blot eine Antikörperreaktion bei ~17 kDa (Abb. 28). Die Bildung stabiler Di- resp. Oligomere von FGF-BP wurde bereits zuvor von Aigner *et al.* sowie Sauter *et al.* beschrieben [129, 131]. Eine Analyse der zu transkribierenden Fremd-DNAs hinsichtlich der *codon usage* in den jeweiligen heterologen Expressionssystemen ergab, dass in keinem der eingesetzten Wirtsorganismen ein eventueller Mangel an entsprechenden tRNAs zu einem Translationsabbruch führen sollte. Folglich wurde keine speziesspezifische Triplettoptimierung durchgeführt. Zur Konstruktion der Expressionsplasmide für *full length* FGF-BP und dessen Deletionsmutanten (siehe Abb. 26) konnten daher direkt amplifizierte cDNAs aus humanen Zellen eingesetzt werden.

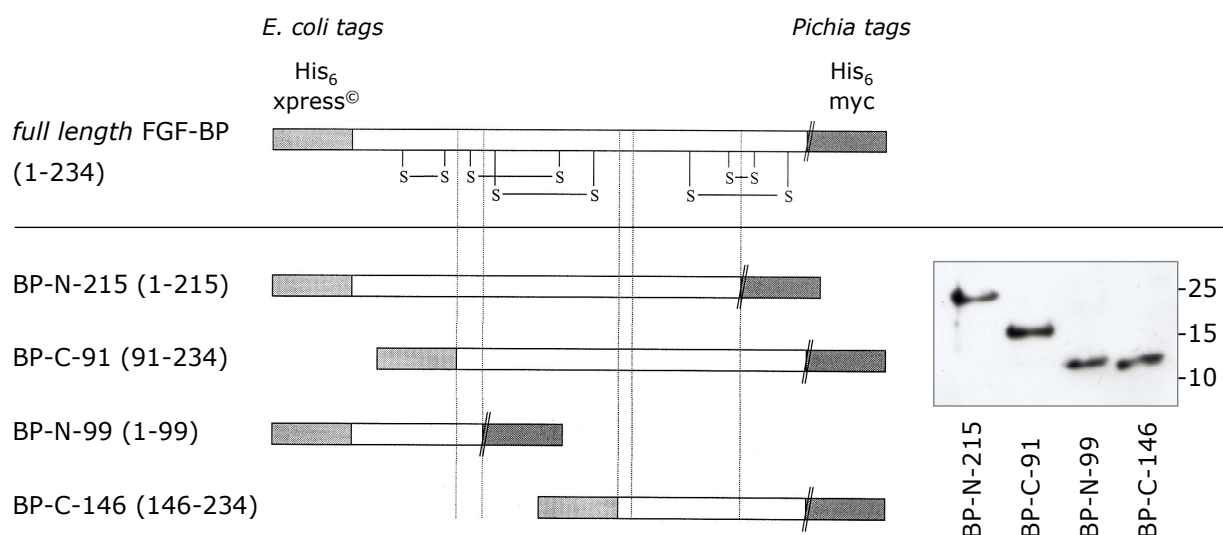


Abb. 26: Schematische Übersicht über die konstruierten FGF-BP-Deletionsmutanten.

Oben: Primärstruktur von humanem *full length* FGF-BP. Unten: Die Verkürzungsmutanten sind so abgeleitet, dass wichtige strukturegebende Disulfid-Brücken (-S-S-) nach der Mutagenese gezielt verloren gehen. In *Pichia pastoris* hergestellte FGF-BPs tragen die Affinitäts- sowie Epitop-tags N-terminal, in Bakterien produzierte Proteine werden C-terminal markiert. Unten rechts: Immunoblot von rekombinanten *E. coli* FGF-BP-Deletionssmutanten (Anti-xpress).

4.7.1 Arbeiten in *P. pastoris*: Aufrechterhalten des Selektionsdrucks ist erforderlich für eine rekombinante Expression

Bei *P. pastoris* ist eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl an stabil integrierten Expressionskassetten und der daraus resultierenden Proteinproduktionsmenge beschrieben [294, 295]. Um zu überprüfen, ob eine Mehrfachintegration sich ebenfalls bei der rekombinanten Expression von FGF-BP positiv auf die Produktionsrate auswirkt, wurde über den dominanten Marker des *neo*-Gens (G418-Resistenz) selektioniert und vermehrt nach sog. *High-Performern* mit *multi copy*-Insertionen gesucht. Dabei konnte bestätigt werden, dass nur wenige aller transformierten Klone das *neo*-Gen in einer vielfachen Kopienzahl exprimieren (Abb. 27). Im Folgenden ist es laut Hersteller nach einem einmal abgeschlossenen Selektionierungsprozeß von stabilen Zellen nicht notwendig, in weiteren Kultivierungsschritten den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Da jedoch unter G418-freien Bedingungen nahezu keine Proteinproduktion stattfand, musste unter permanent hohen Antibiotikakonzentrationen gearbeitet werden (Abb. 28). Durch diese Maßnahme war es möglich, noch während der Expression Einfluß auf die Proteinausbeute zu nehmen. Beim Vergleich von hochresistenten Klonen ([G418]=5mg/ml) mit solchen, die bei lediglich 0,5 - 2 mg/ml G418 überlebensfähig waren, war eine direkte Korrelation zwischen Expressionsrate und Gen-Dosis-Effekt ermittelbar, so dass im Folgenden nur unter ständiger G418-Zugabe gearbeitet wurde. Desweiteren war festzustellen, dass eine Expression in ungepuffertem Minimalmedium (MM) schnell zur Übersäuerung desselben führte ($\text{pH} < 3$) und unter diesen Bedingungen entweder keine Produktion stattfand oder produziertes Protein schnell degradierte. Bei der Einstellung des Minimalmediums auf pH 6,5 (=BMM, 100mM Na-Phosphat pH 6,5) wurde die höchste Expressionsrate erzielt, verglichen zu einer Pufferung auf pH 5,5 bzw. 7,5. Ein regelmäßiger Zusatz von Proteaseinhibitoren zum Kulturmedium (PMSF bzw. Roche *Complete*®-Tabs) konnte die Ausbeute nicht verbessern. Wenigstens 4 Tage Induktion waren notwendig, um detektierbare Mengen an Protein zu erhalten (Abb. 28). Eine Verlängerung des Expressionszeitraums auf 7-8 Tage erzielte keine Zunahme bei der Proteingewinnung. Die in Abb. 26 gezeigten Deletionsmutanten von FGF-BP wurden ebenfalls in pPIC9K eingebracht und analog zur Vorgehensweise wie beim *full length* Protein exprimiert.

Abb. 27: Transformationsansätze von *P. pastoris* GS115 auf Selektionsagar mit unterschiedlichen G418-Mengen. Eine stabile Mehrfachintegration von Expressionsplasmiden, welche mit einer erhöhten Antibiotikaresistenz einhergeht, findet nur selten statt. Auf G418-freien YPD-Platten wachsen alle Transformanten, bei 0,5mg/ml überleben hingegen nur noch ~30% aller Kolonien.

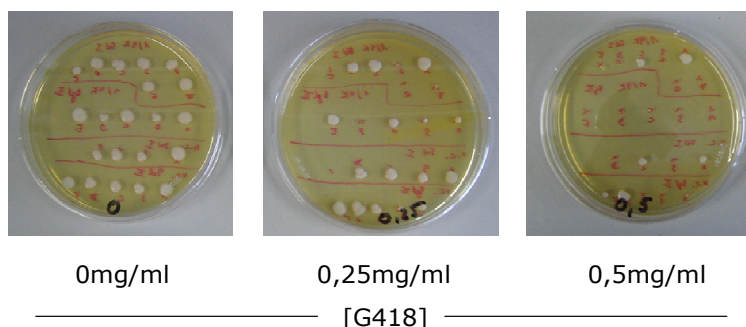
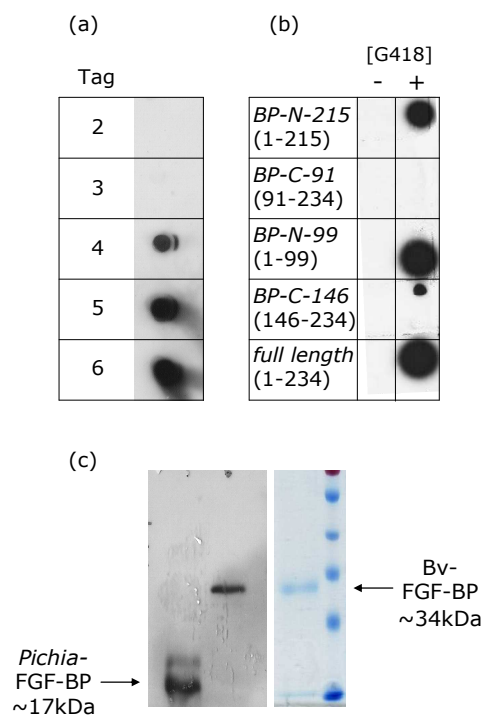


Abb. 28: Immunoblots einer rekombinanten *Pichia pastoris*- sowie Insektenzellexpression von FGF-BP.

(a) Die Proteinausbeute bei der rekombinanten FGF-BP-Produktion in *P. pastoris* ist abhängig von der Expressionsdauer. Der Proteingehalt steigt kontinuierlich bis zum Tag 6 nach Induktion in dem konditionierten Überstand der Expressionskultur an. Längere Induktionszeiträume erzielen keine Verbesserung in der Ausbeute (Expression unter täglichem Hinzufügen von G418 sowie 0,5% MeOH, jeweils 8 µl Kulturmedium aufgetragen (Anti-BP-Peptide)).

(b) unter G418-freien Produktionsbedingungen wird kaum rekombinantes FGF-BP erhalten. N-terminale Verkürzungen werden nicht exprimiert (Anti-myc-tag).

(c) Die SDS-PAGE zeigt, dass Proben von full length FGF-BP aus Hefen (*Pichia*) bzw. Insektenzellen (Bv) unterschiedliche Laufhöhen aufweisen. Links: Western blot von *Pichia*- und Bv-FGF-BP (Anti-BP_i). Rechts: Coomassie-Stain von gereinigtem Bv-FGF-BP.



4.7.2 Proteinproduktion sowie Koexpression mit Fusionspartnern in *E. coli*

Um die beobachtete Instabilität von FGF-BP (Aigner, unveröffentlichte Daten) in einem Expressionssystem näher zu untersuchen, in welchem üblicherweise hohe Proteinmengen erhalten werden (*E. coli*), wurde eine rekombinante Expression mit Hilfe eines Plasmids aus der pGEX-Vektorfamilie durchgeführt. Dieses etablierte Verfahren erlaubte die Expression eines nicht-sezernierten Proteins mit Glutathion-S-Transferase (GST) als Fusionspartner. Die Sequenz der rekombinanten DNA wurde nach der Transformation in den Expressionsstamm BL-21 erneut analysiert, um eine etwaige Verschiebung des Leserasters bzw. das Vorhandensein von unerwünschten Stopcodons sowie Nonsens-Triplets sicher ausschließen zu können.

Eine Reinigung von GST-getaggten Proteinen ist, sofern reduziertes Glutathion (GSH) als Affinitätspartner für GST dient, ausschließlich unter nicht-denaturierenden Bedingungen möglich, da nur das in einer nativen Konformation vorliegende Enzym aktiv an die GSH-Matrix binden kann. Bei der Reinigung von GST-FGF-BP wurde jedoch nahezu ausschließlich „freies“ GST-Protein in den Eluatfraktionen aufgefunden, selbst bei Verwendung oberflächenaktiver Detergentien (Triton X-100). Lediglich eine finale denaturierende Elution mit SDS erbrachte geringe Mengen an stabilem FGF-BP (Abb. 29). Im Folgenden war es das Ziel, das in SDS-Lösung vorliegende Fusionsprotein von freiem GST zu isolieren indem hinter die FGF-BP-Sequenz zusätzlich ein C-terminaler His₆-tag eingebaut

wurde. Da dieser Affinitätstag ebenfalls das Arbeiten unter denaturierenden Bedingungen erlaubte, war es nun möglich, im Zuge einer nachfolgenden, zweiten Reinigung das GST-FGF-BP von freiem GST abzutrennen. Durch diese Vorgehensweise konnten geringe Mengen einer sauberen Proteinfraction erhalten werden (Abb. 30). Eine vorhandene Thrombinspaltstelle im Vektor, welche im translatierten Bereich der MCS liegt (und somit genau zwischen dem Fusionpartner und FGF-BP), wurde dazu genutzt, um FGF-BP von GST abzutrennen. Allerdings führte die Thrombinspaltung jedoch nicht zum Erhalt einer reinen FGF-BP-Probe, da unter den für eine Spaltungsreaktion notwendigen nativen Pufferbedingungen das Protein nicht stabil blieb. Daher wurde für weitere Experimente (z.B. *Pulldown*-Assays) das GST-Fusionsprotein eingesetzt.

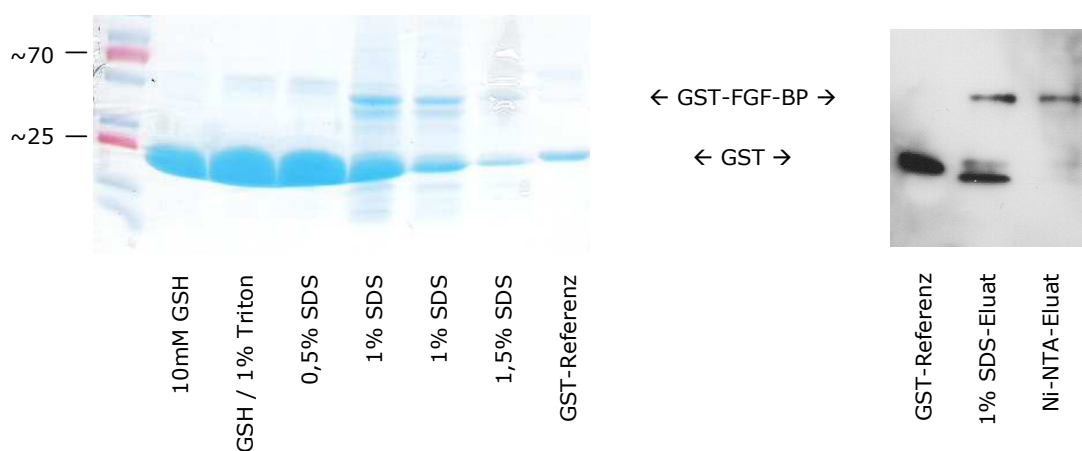


Abb. 29: Reinigungsprofil von GST-FGF-BP (Coomassie-Stain).

Nur unter denaturierenden Elutionsbedingungen mit SDS als Detergens werden geringe Mengen an rekombinantem GST-FGF-BP erhalten (Bande bei ~50kDa). Alle Eluatfraktionen sind stark mit freiem GST-Protein kontaminiert (Bande bei ~25 kDa).

Abb. 30: Abtrennung des GST-FGF-BP von freiem GST-Protein (Western blot).

Durch eine Reinigung über den C-terminalen His-tag kann GST-FGF-BP von seinem N-terminalen Fusionspartner aus dem SDS-Eluat abgetrennt werden. (Ni-NTA-Agarose-Pulldown, Anti-BP₁).

Da die Expression des GST-Fusionsproteins keine ausreichenden Mengen an Protein lieferte, wurde FGF-BP in ein weiteres bakterielles Expressionssystem (pTrcHis) kloniert. Dieses Plasmid erlaubte die Reinigung über einen His₆-tag, zusätzlich erfolgte eine Epitopmarkierung, durch welches eine Visualisierung auch geringer Proteinmengen möglich war (Anti-*xpress*-tag). Der Vergleich mehrerer Strategien bei der Proteinreinigung ergab, dass sowohl denaturierende als auch native Bedingungen zum Erhalt detektierbarer Proteinmengen führen, jedoch mit unterschiedlich hohen Ausbeuten. Bei gleichen Expressionskultur-Ausgangsmengen war die nach dem denaturierendem Zellaufschluß erhaltene Aufarbeitung deutlich reicher an rekombinantem FGF-BP als bei Verwendung nativer Puffer (Abb. 31). Allerdings führte die Puffer E-Elution mit auch zu einer starken Kontamination mit unspezifischen Proteinen. Ein sog. „Hybridprotokoll“ erbrachte keine verbesserte Ausbeute bzw. reine Proteinfraction. Bei dieser Methode erfolgten Zellaufschluß sowie Proteinbindung in einem

denaturierendem Milieu (6 M GuHCl bzw. 8 M Harnstoff). Anschließend wurde im Zuge der einzelnen Waschschriffe sukzessive auf native Pufferbedingungen gewechselt, mit dem Ziel, das Protein noch während der Reinigungsprozedur auf der Säule zu renaturieren (nicht gezeigt).

Möglicherweise lag bakterielles FGF-BP in Form von *inclusion bodies* vor. Daher wurden bei der Expression mehrere Parameter im Einzelnen (Inkubatortemperatur, IPTG-Konzentration, Expressionsdauer) adressiert, um die Bildung dieser schwerlöslichen Aggregate zu unterbinden. Die Induktion über lange Zeiträume (18 h) bei niedrigen Temperaturen (16°C) übte keinen positiven Effekt auf die Proteinausbeute aus. Kurze Zeiträume von 2-4 h waren zu gering, um detektierbare Mengen an FGF-BP zu erhalten. Hinsichtlich der IPTG-Konzentration führte der Bereich zwischen 0,1mM bis 5mM zu keinem meßbaren Unterschied. Nach verschiedenen Optimierungsschritten wurde im Folgenden routinemäßig für 5 h bei 37°C unter 0,5 - 1mM IPTG produziert. Die Reinigung erfolgte unter den oben beschriebenen denaturierenden Bedingungen, da das Protein nur in Puffer E für längere Zeit stabil lagerbar war. Die in Abb. 26 gezeigten FGF-BP-Deletionsmutanten wurden ebenfalls in das bakterielle Expressionssystem eingebracht und analog zum *full length* Protein exprimiert.

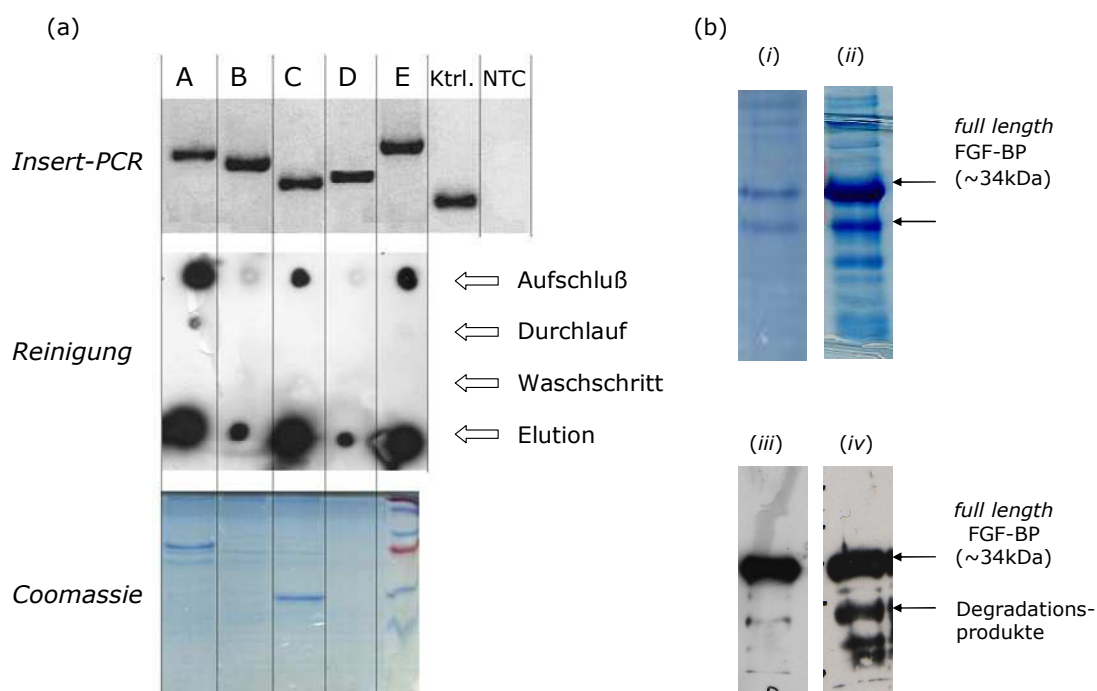


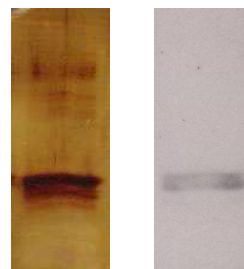
Abb. 31: Reinigung von *E. coli* full length FGF-BP sowie verschiedenen FGF-BP-Deletionsmutanten.

(a) Die Insert-PCR aus den Expressionskulturen zeigt den Erfolg der Transformation in den Expressionsstamm BL-21 (A=BP-N-215, B=BP-C-91, C=BP-N-99, D=BP-C-146, E=full length FGF-BP, Ktrl.=pTrcHis NTC=no template control, PCR mit pTrcHis-Vektorprimern). Der Dot blot gibt das Elutionsprofil einer denaturierenden Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose wieder. Im Säulendurchlauf sowie während der Waschschriffe (Puffer B-D, hier Puffer C) blutet kein FGF-BP von der Säule aus, erst im Elutionspuffer E (pH 4,0) erscheinen die rekombinanten Proteine. Analog zu den Proteinen aus *P. pastoris* werden N-terminale Verkürzungen nur sehr schlecht exprimiert. Unten: Coomassie-Gel einer nativen Reinigung. (b) Vergleich einer nativen (i) vs. denaturierenden (ii) Proteinreinigung (Coomassie). Full length FGF-BP läuft bei ~34 kDa, die unmittelbar darunter liegende starke Proteinbande ist unspezifisch und stellt bei der Reinigung aller Konstrukte eine kontaminierende Proteinfraction dar, welche jedoch mit keinem Antikörper (Anti-tag resp. Anti-FGF-BP) kreuzreagiert. Unten: Immunoblots mit Anti-FGF-BP₁ (iii) sowie Anti-xpress (iv). Der Western blot (iv) verdeutlicht, dass ebenfalls N-terminal verkürzte Proteinfragmente im Elutionspuffer vorliegen.

Rekombinante Expression von *E. coli* HMGA

Die rekombinante Expression von HMGA funktionierte mit dem bakteriellen pTrcHis-Expressionssystem hingegen problemlos. Unter Einhaltung der vom Hersteller empfohlenen Standardbedingungen (5h bei 37°C, 1mM IPTG) wurden bei einem Kulturansatz im 1- bis 2 l-Maßstab Proteinmengen im mg-Bereich erhalten (Abb. 32). In Puffer E war das Protein für mehrere Wochen bei 4°C stabil lagerbar und konnte bei Bedarf nahezu verlustfrei in physiologische Lösungen umgepuffert werden.

Abb. 32: rekombinante Expression von *E. coli* HMGA.
Links: Silberfärbung einer Proteinreinigung.
Rechts: Immunoblot mit Anti-HMGY (FL-95).
Das Protein erscheint als Doppelbande bei ~16-18kDa.

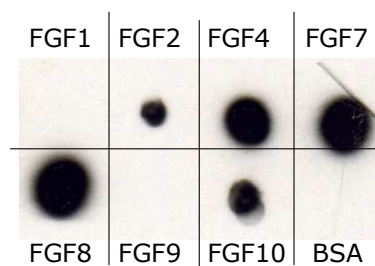


4.8 Auffinden neuer Interaktionspartner von FGF-BP

4.8.1 FGFs

Um in einem zellfreien Assay die Bindungseigenschaft rekombinanter FGF-BPs an verschiedene Fibroblasten-Wachstumsfaktoren zu untersuchen, wurden eine Reihe kommerziell erworbener FGFs (in *E. coli* produziert) auf einer Membran immobilisiert und im Liganden-Dot blot mit unterschiedlichen Proteinproben inkubiert. Die Immundetektion erfolgte mit mehreren Primärantikörpern, um die Spezifität der Bindung zu gewährleisten (gegen FGF-BP- bzw. Epitop-tags gerichtet). Als Negativkontrolle diente eine äquivalente Menge an BSA. Unter Verwendung dieser Methode wurde ermittelt, dass FGF-BP an FGF2, -4, -7, -8 und -10 bindet (Abb. 33). Die beschriebene Interaktion von FGF-BP mit FGF1 [128] konnte jedoch nicht beobachtet werden. Ferner war die Bindeaffinität abhängig vom exprimierenden Wirtsorganismus. Die Interaktion mit FGF10 war nur bei dem in *E. coli* produzierten Protein zu sehen. Dies steht möglicherweise in einem Zusammenhang mit der Qualität der Ausgangsproben, da die Ausbeute im bakteriellen Expressionssystem am besten war, verglichen zu den anderen Herkunftsquellen. Die Reaktion mit FGF2 war bei allen Proteinen nur relativ schwach ausgeprägt, obwohl FGF2 als prominentester Interaktionspartner für FGF-BP gilt.

Abb. 33: Liganden-Dot blot von FGF-BP mit verschiedenen FGFs: Der Blot zeigt die direkte Interaktion von *E. coli* FGF-BP mit FGF2, -4, -7, -8 und -10. Es besteht hingegen keine Wechselwirkung mit FGF1 sowie -9. Die Negativkontrolle (äquivalente Menge an BSA) zeigt ebenfalls kein FGF-BP-vermitteltes Signal. Auffällig ist das vergleichsweise schwache Signal bei FGF2. Detektion mit FGF-BP-spezifischen IgGs sowie Antikörpern gegen Epitop-tags (hier Anti-xpress).



4.8.2 HMGA

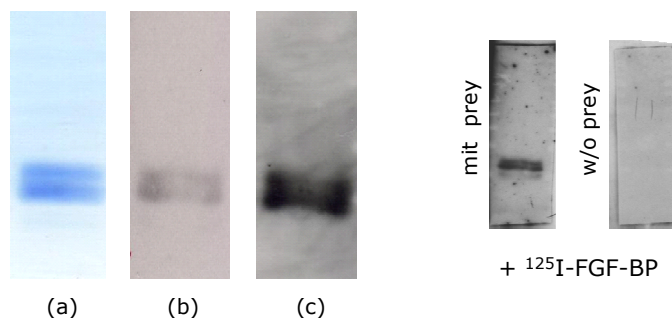
Vorarbeiten, welche Hinweise auf einen weiteren möglichen Interaktionspartner von FGF-BP lieferten, wurden im Rahmen dieser Arbeit näher ausgeführt. Dazu wurde der potentielle Kandidat, HMGA1 (ein Vertreter aus der HMG-Proteinfamilie) rekombinant exprimiert und gereinigt. Um den Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion von FGF-BP mit HMGA1 zu erbringen, kam die Far Western-Methode zum Einsatz (siehe Abschnitt 3.2.5.9). Die Reaktion von immobilisiertem HMGA1 als *bait* mit [125 I]-FGF-BP ergab eine spezifische Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen (Abb. 34). Zur Kontrolle wurde der Versuch auch umgekehrt durchgeführt, mit immobilisiertem FGF-BP und [125 I]-HMGA als *prey* (nicht gezeigt). Um die Interaktion mit einer weiteren Methode zu belegen, wurden Liganden-Dot blots analog 4.8.1 mit Protein-spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Abb. 34: Far-Western blot von HMGA mit *E. coli* [125 I]-FGF-BP.

Gezeigt ist die direkte, von zusätzlichen Kofaktoren unabhängige Protein-Protein-Interaktion von FGF-BP mit HMGA.

(a) Gereinigte HMGA-Probe (Coomassie)
(b) Western blot von HMGA (Anti-HMGY)
(c) Autoradiographie mit [125 I]-FGF-BP

Rechts: Als Negativkontrolle dient ein [125 I]-FGF-BP-haltiger Ansatz ohne zuvor geblottetes HMGA (w/o prey).

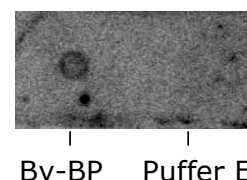


4.8.3 Nukleinsäuren (DNA)

Um die Frage zu adressieren, ob FGF-BP an DNA bindet, wurde rekombinantes FGF-BP aus Insektenzellen (BvBP) auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und, nach dem Blockieren, mit restringierter, [32 P]-markierter Plasmid-DNA³⁸ inkubiert. Die autoradiographische Auswertung des Blots zeigte eine spezifische Anreicherung von Radioaktivität an der Stelle, an welcher zuvor Protein immobilisiert worden war (Abb. 35).

Abb. 35: Protein-Southern Hybridisierung von [32 P]-markierter Plasmid-DNA mit Baculovirus FGF-BP (Bv-BP).

In Puffer E vorliegendes rekombinantes FGF-BP bindet radioaktiv markierte Plasmid-DNA. Puffer E zeigt keine Reaktion. Auch BSA als unspezifisches Protein führt zu keinem Signal (nicht gezeigt).



38) Zwei über Nick-Translation gelabelte Fragmente zu ~1,5 und ~5,4 kbp Länge.

4.9 Stabilitätsuntersuchungen und DNA-Bindung

4.9.1 Thermische Instabilität von FGF-BP

Die stets zu verzeichnende, schlechte Ausbeute bei der Proteinexpression ging mit der Beobachtung einher, dass Proben von rekombinantem FGF-BP in physiologischen Lösungen, selbst nach kurzen Zeiträumen, einen starken Verlust an wiederauffindbarem Protein aufwiesen. Um mögliche Parameter zu ermitteln, welche an diesem Degradationsprozeß beteiligt sein könnten, wurden Probelösungen mit variierenden FGF-BP-Gehalten unterschiedlichen experimentellen Bedingungen ausgesetzt und die verbleibenden Proteinmengen im Dot blot quantitativ miteinander verglichen. Dabei wurde u.a. unter thermisch forcierten Bedingungen gearbeitet, um den Einfluß der Temperatur auf die Zersetzung zu ermitteln. Parallel dazu erfolgte ein Reaktionsansatz, bei welchem ein Teil der Ausgangsprobe bei 4°C gleichsam behandelt wurde. Zur Erfassung der initialen Proteinmenge diente ein Probenaliquot, welches zum Zeitpunkt 0 des Experiments ($= t_0$) auf eine trockene Blottingmembran aufgebracht wurde.

Es konnte reproduzierbar beobachtet werden, dass physiologische Lösungen mit FGF-BP bereits nach wenigen Stunden bei 37°C ($= t_x$) deutlich geringere Proteinmengen beinhalteten als zum Ausgangszeitpunkt t_0 . Der Mengenverlust bei der 4°C-Probe während dieses Inkubationszeitraums war weniger stark ausgeprägt als bei der 37°C-Probe (Abb. 36).

4.9.2 Degradation von FGF-BP verläuft Protease-unabhängig

Die Frage, inwieweit die Degradation von FGF-BP unter erhöhten Temperaturen auf die Aktivität von Proteasen zurückzuführen ist, wurde einerseits dahingehend untersucht, ob das Protein während der Expression durch den Zusatz von spezifischen Proteaseinhibitoren stabilisiert werden kann, andererseits ob durch Zugabe dieser Inhibitoren zu gereinigten Testlösungen der Proteinzerfall verlangsamt abläuft. Dazu fanden systematische Dot blot-Analysen mit frischen Proteinproben statt welche mit unterschiedlichen Proteaseinhibitoren (Roche *Complete*®-Tabs, 100µM PMSF, 750µM EDTA) versetzt und verbleibende Proteinmengen in einer Zeitabhängigkeit ermittelt wurden. Beim Vergleich von Proteaseinhibitorhaltigen Ansätzen mit unbehandelten Proben ergaben sich auch nach einer längeren Inkubationsdauer keine Unterschiede hinsichtlich des FGF-BP-Gehalts zwischen diesen Ansätzen. Dies war einheitlich bei sämtlichen Inhibitoren zu beobachten, so dass die Instabilität von FGF-BP nicht auf die Anwesenheit von Proteasen, welche als eventuelle Kontaminanten bei einer Proteinaufarbeitung mit aufgereinigt wurden, zurückzuführen war.

4.9.3 Genomische DNA stabilisiert FGF-BP

Da Nukleinsäuren potentielle Interaktionspartner von FGF-BP sind (siehe Abschnitt 4.8.3) wurde untersucht, ob eine putative, direkte Interaktion von FGF-BP mit DNA sich protektiv auf die Protein-

stabilität auswirkt. Es wurden Reaktionsansätze mit identischen Proteinausgangsgelhalten hergestellt und nach dem Zusatz von unterschiedlichen Nukleinsäuren unter thermisch forcierten Bedingungen analog 4.9.1 behandelt. In Dot blots war klar zu erkennen, dass Zusätze von genomischer sowie Plasmid-DNA den Degradationsprozeß von FGF-BP deutlich aufhalten konnten (Abb. 36). Kurze Oligonukleotide (<60 nt.) sowie freie dNTPs hatten hingegen keinen positiven Einfluß auf die Proteinstabilität. Um die durch Nukleinsäuren vermittelte Stabilisierung von FGF-BP hinsichtlich eines DNA-spezifischen Effekts zu überprüfen, wurde in weiterführenden Experimenten mit gleichen DNA- sowie Proteinmengen gearbeitet. Zusätzlich zu den o.g. genannten Bedingungen erfolgte ein Reaktionsansatz unter Zusatz von DNaseI, durch welchen die vorhandenen Nukleinsäuren wieder enzymatisch abgebaut wurden. Dot blot-Analysen konnten zeigen, dass eine DNA-vermittelte Protein-stabilisierung infolge eines DNase-Verdau wieder aufgehoben wird (Abb. 36).

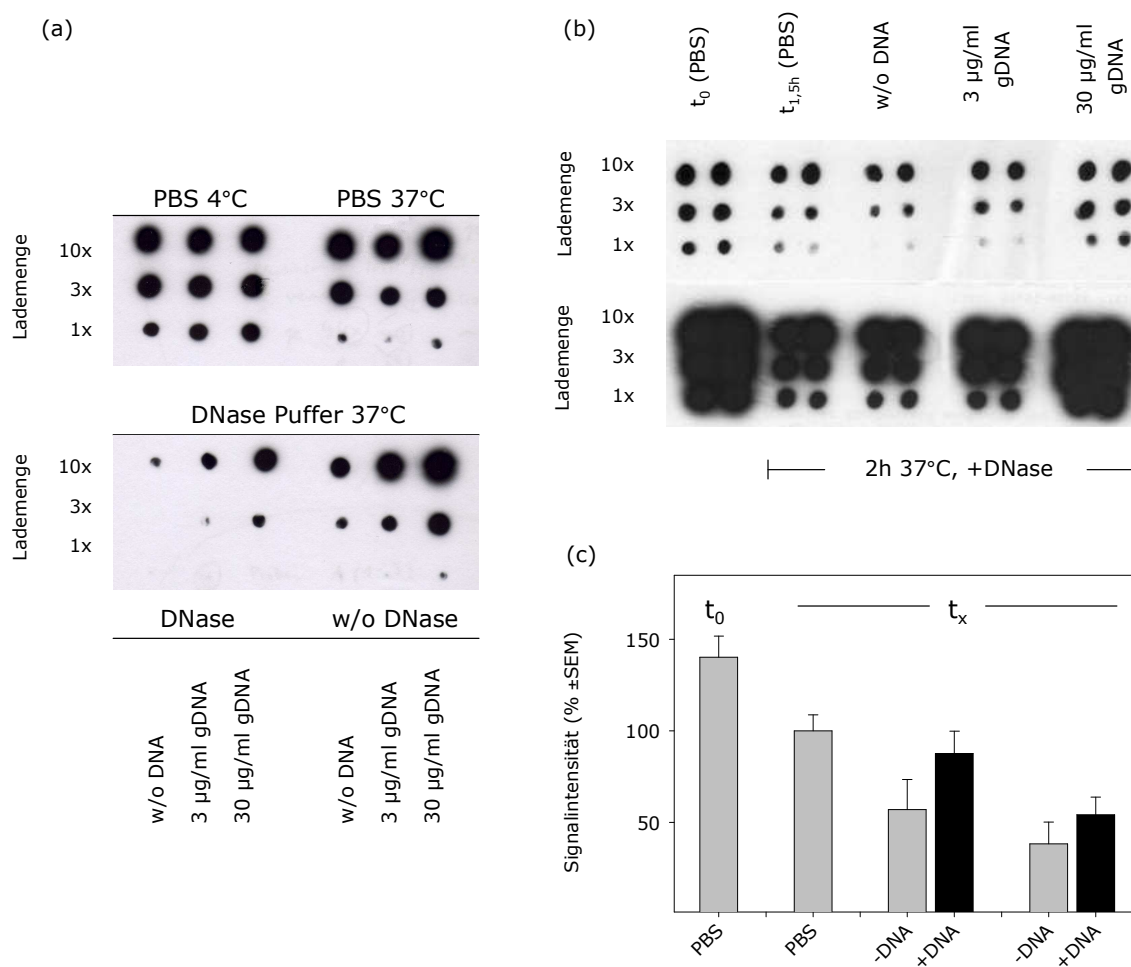


Abb. 36: Degradation von FGF-BP in physiologischen Lösungen bei erhöhter Temperatur (in vitro-Stabilität). (a/b) Die Dot blots zeigen, dass bei erhöhte Temperaturen Lösungen von rekombinantem FGF-BP (hier aus *E. coli*) rasch zerfallen. Nach einer ~2-stündigen Inkubation ist in der 37°C-Probe deutlich weniger Protein wiederauffindbar als in der 4°C- bzw. Ausgangsprobe zum Zeitpunkt t_0 . In Nukleinsäure-haltigen Ansätzen läuft der Degradationsprozeß verlangsamt ab. Durch eine Zugabe von DNA zu den Testlösungen wird FGF-BP konzentrationsabhängig stabilisiert. Der enzymatische Abbau der zugesetzten DNA (DNase-Verdau) hebt die DNA-vermittelte Protein-stabilisierung wieder auf (Anti-BP_i). (c) Densitometrische Auswertung von 4 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten, normiert auf Zeitpunkt t_x (PBS) \pm SEM (t_x entspricht Inkubationszeiträumen von ~1,5 - 4h bei 37°C).

5 Diskussion

5.1 Gentherapeutische Überlegungen und Vergleich verschiedener FGF-BP-*targeting* Strategien

Unter Einsatz klassischer Methoden bei der Wirkstoffentwicklung ist es nicht möglich, gegen jede pharmakologische Zielstruktur auch entsprechende Pharmaka abzuleiten. Hochrechnungen Hopkins' zufolge eignen sich nur rund 5% aller krankheitsrelevanten Gene als potentielle „*druggable targets*“ [296]. Wenn man zusätzlich Lipinskis „*rule of five*“ [297] berücksichtigt, kann gefolgert werden, dass nur gegen einen Bruchteil aller biologischer Angriffspunkte niedermolekulare Arzneistoffe (sog. *small molecules*) gefunden werden können, welche hoch wirksam *und* peroral bioverfügbar sind. Vor diesem Hintergrund wird die Idee einer Gentherapie verständlich, denn auf Nukleinsäure-Ebene kann theoretisch jedes beliebige Gen inhibiert werden. So eignet sich die RNAi-Technik nicht nur zur *target*-Validierung (zur Übersicht [298-300]), die Intention gentherapeutisch in Krankheitsgeschehen einzugreifen, hat längst Eingang in die Klinik gefunden. Dabei ruht das Potential dieser Therapierichtung insbesondere in der Behandlungsmöglichkeit von Erkrankungen, welche mit einer pathologisch veränderten Hochregulation bestimmter Genprodukte assoziiert sind (z.B. Virusbefall³⁹, neurodegenerative Leiden, Entzündungsprozesse oder AMD). In all diesen Fällen ist eine Heilung (Eradikation bzw. Remission) meist nur dann möglich, wenn eine *vollständige* Inhibition der Zielstruktur (z.B. virale Gene, Autoimmun-Antigen) erfolgt. Auf diesem Prinzip beruht auch das therapeutische Gen-*targeting* bei Krebserkrankungen, da Tumorgeschehen nahezu ausnahmslos mit der Überaktivität bestimmter Onkogene bzw. Angiogenesefaktoren (bei gleichzeitigem Verlust von Tumorsuppressorgenen) einhergeht. Bei näherer Betrachtung der aktuellen Datenlage aller laufenden gentherapeutischen klinischen Studien wird ersichtlich, dass ~2/3 aller derzeitigen gentherapeutischen Untersuchungen eine Antitumorbehandlung zum Ziel haben [301].

- **Ribozym-vermitteltes FGF-BP-*targeting***

Während die Hoffnungen in RNAi-basierte Methoden kontinuierlich anwachsen (zur Übersicht [302, 303]), fällt auf, dass Ribozym-vermittelte Strategien zunehmend an Stellenwert verlieren. Experimente mit Ribozym-transfizierten Zellen ermöglichen zwar Aussagen über die Funktion eines bestimmten Genprodukts (sog. *loss-of-function* Analysen), jedoch ist diese Methode für die klinische Anwendung eher ungeeignet. Um ihre Wirksamkeit zu entfalten, müssen Ribozyme intrazellulär als einzelsträngige

39) Geisbert *et al.* zeigten unlängst eindrucksvoll die Wirksamkeit von siRNAs bei der Postexpositionstherapie von Primaten, welche mit Ebolaviren infiziert waren. Keines der Tiere die spezifisch behandelt wurden, ist während des Untersuchungszeitraums verstorben. Tiere in den Kontrollgruppen waren hingegen bereits nach wenigen Tagen tot [234].

Moleküle vorliegen. Exogen zugesetzte RNA-Moleküle erreichen aufgrund der Instabilitäten der Nukleinsäuren (Hydrolyse-/Nukleaseanfälligkeit) nur unzureichende Plasmaspiegel. Der Versuch, dies durch die Applikation höherer Dosen zu kompensieren, würde jedoch Probleme durch unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) weiter verschärfen. Die Möglichkeit, die katalytische RNA von den Zielzellen selbst transkribieren zu lassen, indem man sie über DNA-basierte Expressionsvektoren direkt in den Tumor einbringt, stellt allenfalls eine theoretische Option dar, da in der Praxis generell eine chirurgische Entnahme der entarteten Zellen bevorzugt durchgeführt wird. Auch wenn die Ribozym-technik somit vermutlich keine Alternative zu bestehenden Behandlungsansätzen in der Krebstherapie darstellen wird, so hat sie als etablierte Methode zur Verminderung der Genexpression in der molekularen Tumorforschung einen hohen Stellenwert erlangt.

Durch die in dieser Arbeit verwendeten *hammerhead*-Ribozyme konnte in zahlreichen *in vitro*- sowie *in vivo*-Untersuchungen an verschiedenen Tumormodellen der Nachweis erbracht werden, dass FGF-BP ein relevantes *target* in der Krebstherapie darstellt [147, 148, 165]. Ein Ziel dieser Arbeit war es, mittels *knockdown*-Phänotypen den biologischen Beitrag von FGF-BP in der Chemoresistenz von Zervixkarzinomzellen gegenüber Standardwirkstoffen in der Tumorthherapie zu ermitteln. Dazu wurden klonale ME-180-Zellen untersucht, bei denen die *targeting*-Strategie mittels Ribozymen zu einer Verminderung der FGF-BP-Expression um mehr als 50% auf Proteinebene (Western blot) führte. Durch Verwendung verschiedener isogener Zelllinien mit unterschiedlich hohen *knockdown*-Effizienzen war es möglich, bei diesen Untersuchungen eine Gen-Dosis-Wirkung zu berücksichtigen. Mit Hilfe der Ribozym-Technik konnte damit erstmals gezeigt werden, dass FGF-BP die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika beeinflusst (Details dazu siehe Abschnitt 5.5).

- ***siRNA-vermitteltes FGF-BP-targeting in vivo***

Eine Vielzahl an Untersuchungen zeigten einen Zusammenhang zwischen der Überexpression von FGF-BP und der Entstehung kolorektaler Entartungen CRC [47, 48, 130, 147, 151]. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Kolonkarzinom-Modellzelllinie LS174T vorrangig untersucht, um die bestehenden Erkenntnisse über FGF-BP in der Tumorigenese von CRC zu erweitern. Durch die Verwendung eines RNAi-vermittelten Gen-*targetings in vivo* kam eine vielversprechende Methode zum Einsatz, welche derzeit in mehreren Phase-III-Studien untersucht wird (zur Übersicht [301]). Mit einer auf Polyethylenimin (PEI) basierenden siRNA-Delivery konnte im Kolonkarzinom-Mausmodell eine ~30%ige Reduktion der FGF-BP-Spiegel in LS174T-Xenotransplantaten erreicht werden. Mäuse, welche mit einer spezifischen FGF-BP-siRNA behandelt wurden, entwickelten dabei um ~25% kleinere Tumore als Tiere in den Kontrollgruppen. Das katalytische Potential der dabei verwendeten siRNA wurde zuvor in der Zellkultur bestätigt. Zahlreiche mit INTERFERIn durchgeführte Transfektionen zeigten reproduzierbar bei mehreren Zelllinien, dass mit der siRNA siBP46 *in vitro knockdown*-Effizienzen von bis zu 70% (*qRT-PCR*) erreichbar waren. Das *in vivo* verwendete PEI hingegen

bewirkte als *in vitro*-Transfektionsreagenz für LS174T keine gute Herunterregulation der FGF-BP-Spiegel⁴⁰. Da PEI jedoch gebundene siRNAs über mehrere Tage stabilisiert⁴¹ und die Applikation der Nukleinsäurekomplexe dreimal wöchentlich wiederholt wurde, kann auch über den Experimentalzeitraum von ~3 Wochen von ausreichend hohen siRNA-Spiegeln im murinen Kreislauf ausgegangen werden. Insofern konnte die PEI-vermittelte siRNA-Delivery *in vivo* unter pharmakodynamischen Gesichtspunkten möglicherweise bessere therapeutische *targeting*-Effizienzen bewirken als unter *in vitro*-Bedingungen, in welchen die Zellen nur einmalig (bzw. ein zweites Mal) transfiziert wurden. Um nachzuweisen, dass die siRNAs nach einer *s.c.*-Applikation und nachfolgend systemischer Zirkulation den Tumor in ausreichender Menge erreichten, wurde eine *in vivo*-Distributionsstudie durchgeführt⁴². Mit Hilfe von [³²P]-markierten siRNAs konnte so die Bioverteilung der Nukleinsäurekomplexe organspezifisch verfolgt werden. Ferner ergab ein Toxizitätsassay, dass keine durch PEI bzw. Nukleinsäuren unspezifisch vermittelten Wirkungen einen negativen Effekt auf die Untersuchung im Tiermodell hatten (*i.e.* Aktivierung des Immunsystems mit einer inflammatorischen Zytokinantwort)⁴³. Der in dieser Studie von der initialen Knotengröße⁴⁴ abhängige erzielte antiproliferative Effekt ist möglicherweise auf den unterschiedlich hohen Vaskularisierungsgrad einzelner Tumore zurückzuführen. Bei Tumoren geringer sowie mittlerer Größe konnte eine deutliche Therapie-Response festgestellt werden, nicht jedoch bei größeren Transplantaten. Vermutlich erfolgte bei letztgenannten die Penetration der Komplexe in den Tumor schlechter als in kleine und intakte Fremdgewebe, da eine erhöhte Rate an nekrotischem Gewebe in großen und entzündeten Tumoren generell eine verstärkte Infiltration von Makrophagen bedingt. Diese Makrophageneinwanderung könnte eine Degradation der Nukleinsäurekomplexe forciert haben, so dass die Freisetzung der siRNAs in den Entzündungsherden erschwert ablief. Eine solche Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Integrität des Zielgewebes wurde bei PEI-Partikeln bereits beschrieben [308].

- ***shRNA-vermitteltes FGF-BP-targeting***

Da der transiente Charakter von siRNAs es bei *knockdown*-Analysen nicht erlaubt langfristige zelluläre Adaptationsprozesse zu berücksichtigen, wurden shRNA-Expressionsvektoren zur Produktion von siRNAs konstruiert. *In vitro* durchgeführte Analysen von mit shRNA-Expressionsvektoren massen-

40) Die eingeschränkte *in vitro*-Transfizierbarkeit mit PEI ist bei dieser Zelllinie im Labor bereits länger bekannt (unveröffentlichte Daten AG Aigner).

41) PEI schützt vor einer nukleolytischen Degradation durch ubiquitär vorkommende Serumnukleasen. Ferner erhöht es die zelluläre Aufnahme der Nukleinsäuren. Unter Einhaltung eines zuvor ermittelten N/P-Verhältnisses verbleibt die Nettoladung kolloidaler PEI/Nukleinsäure-Partikel auch nach Komplexbildung positiv. Dies erhöht die Adsorption der Komplexe an partiell negativ geladene Zellstrukturen (z.B. Komponenten der EZM), was eine intrazelluläre Akkumulation der Oligonukleotide erleichtert ([251, 304], zur Übersicht [305], Freisetzungsmechanismus nach der sog. „Protonenschwamm“-Hypothese [306]).

42) Freundlicherweise von Sabrina Höbel durchgeführt. Details zur Methodik siehe [307].

43) Ermittlung der murinen Serumlevel von TNF α und IFN γ , ferner Messung von GGT-Transaminase und Alkalischer Phosphatase nach Applikation der Komplexe im ELISA. Freundlicherweise von Daniela Gutsch durchgeführt (Details zur Methodik siehe [307]).

44) Antitumoraler Effekt nur bei Knoten mit initial <100mm³ Tumolvolumen.

transfizierten Zellen resultierten jedoch nicht in einer Verringerung der FGF-BP-Expression. Da eine stabile Transfektion in jeder Einzelzelle einem weitgehend randomisiertem Integrationsprozeß unterliegt, war zu erwarten, dass bei einer heterogenen Zellpopulation, bestehend aus einzelnen klonalen Ereignissen, keine einheitlich hohe *knockdown*-Effizienz erreicht werden konnte. Bei der Analyse auf Anwesenheit der katalytischen shRNA, wurde diese in nur ~2/3 aller stabilen Kolonien eines Transfektionsansatzes aufgefunden. Daraus kann gefolgert werden, dass nicht jeder Einbau eines dominanten Selektionsmarkers auch zwingend zur Integration des gewünschten Genabschnitts (hier: shRNA-Expressionskassette) führt. Aus diesem Grund wurde eine klonale Selektionierung durchgeführt, um Kandidaten mit einer Herunterregulation von FGF-BP zu finden. Dies ermöglichte es, einzelne Zelllinien zu etablieren, welche *targeting*-Effizienzen von bis zu 70% (mRNA/Protein) aufwiesen.

Zusammengefaßt kamen bei den in dieser Arbeit *in vitro* durchgeführten *loss-of-function* Analysen zwei Strategien eines stabilen FGF-BP-*targetings*, d.h. einer stabilen Herunterregulation von *FGF-BP* zur Verwendung: vektorbasierte RNAi und Ribozymtechnik. Beide Methoden führten zu einer robusten Gendepletion. Die sich daraus ergebenden biologischen Effekte werden nachfolgend näher diskutiert.

5.2 Biologische Effekte einer FGF-BP-Depletion sind abhängig von der Kinetik des *knockdowns*

Bei Untersuchungen mit massentransfizierten shRNA-produzierenden Zellen konnte in den resultierenden Populationen kein spezifischer biologischer Effekt nachgewiesen werden, da vermutlich nicht-transfizierte, FGF-BP stark-exprimierende Zellen einen stark FGF-BP-depletierten und damit langsamer proliferierenden Phänotyp rasch überwuchsen. Dies führte möglicherweise zu einer Überdeckung der in den *knockdown*-Zellen entstandenen Alterationen. *In vitro*-Untersuchungen mit siRNAs erreichten zwar auf transkriptioneller Ebene einen im Vergleich zu shRNAs ähnlich guten *knockdown* (~40-70%ige Reduktion der mRNA), jedoch konnten unter den kurzzeitig erzwungenen Senkungen der Genexpression *keine* Auswirkungen auf den resultierenden Phänotyp festgestellt werden. So zeigte sich innerhalb der typischerweise bei siRNA-vermittelten Experimenten gewählten Zeitpunkte (48-144h post Transfektion) keine meßbare Modulation im Zellzyklus. Ebenfalls war der Apoptose-induzierende Effekt eines *knockdown* nur bei konstitutiver FGF-BP-Depletion zu erkennen. Die daraus abgeleitete Hypothese, dass FGF-BP als ein Inhibitor des programmierten Zelltods fungiert, wurde weiter im Überexpressionsmodell untersucht. In FGF-BP-negativen SW-13-Zellen konnte der Apoptose-inhibierende Effekt ebenfalls nur unter stabilen Bedingungen beobachtet werden⁴⁵. Insgesamt deutet

45) Bei der transienten Transfektion eines FGF-BP-Expressionsplasmids wurde die Apoptoserate im gleichen Ausmaß gesteigert wie bei Leervektor-Transfektanten zur Negativkontrolle. Daraus wird gefolgert, dass zytotoxische Wirkungen der Transfektion etwaige spezifische Effekte überdeckt haben könnten.

somit alles darauf hin, dass die Funktionsweise von FGF-BP im „zellulären Kontext“ durch kurzzeitige Veränderungen der Expressionslevel nur schwer zu beeinflussen ist bzw. eine temporäre Suppression der FGF-BP-Konzentration keine unmittelbaren Änderungen in der Homöostase der Zelle hervorruft. Dies soll im folgenden in Hinblick auf die Kinetik des *knockdowns* diskutiert werden.

Bei Durchführung von siRNA-vermittelten Experimenten muss berücksichtigt werden, dass die exogen zugegebenen RNA-Moleküle zwar relativ schnell eine nachfolgende Proteinproduktion unterbrechen bzw. vermindern, verbleibende Restmengen an bereits gebildeten Proteinen jedoch weiterhin ihre biologischen Funktionen entfalten. Alle Strategien, die darauf abzielen, das *target* auf genetischer Ebene zu erfassen, zeigen daher eine Latenzphase bis die Effektorebene erreicht wird und die biologischen Folgen eines *knockdowns* ersichtlich werden. Insofern unterscheiden sich Ansätze, bei denen Nukleinsäuren als *trigger*-Moleküle⁴⁶ fungieren von solchen Verfahren, welche *unmittelbar* in die Effektorebene eingreifen (z.B. Antikörper oder niedermolekulare Inhibitoren) und damit ein geringeres „zeitliches Fenster“ aufweisen. Daraus resultiert, dass eine durch siRNA erzielte Wirkung stark von der Umsatzgeschwindigkeit des *target*-Proteins abhängig ist.

Untersuchungen mit rekombinantem FGF-BP in isolierten *in vitro*-Assays führten zu dessen rascher Degradation, sofern keine stabilisierenden Zusätze vorhanden waren. Folglich liegt der Schluß nahe, dass die Halbwertszeit des *freien* Proteins vermutlich kurz ist und nur durch eine enge wechselseitige Bindung an Interaktionspartner erhöht werden kann. Im physiologischen Zellverband wird diese Bedingung erfüllt. FGF-BP bindet außerhalb der Zelle mit hoher Affinität an verschiedene FGFs sowie zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix [144, 152, 181]. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden, dass FGF-BP intrazellulär über mindestens einen weiteren Bindepartner verfügt (Details siehe Abschnitt 5.6). Unter Berücksichtigung der extrazellulären Funktionsweise wäre es folgerichtig, wenn FGF-BP nach dem Transport seiner FGF-Bindepartner zu deren Wirkort (FGFR) dem physiologischen Gleichgewicht durch eine rasche Degradation wieder entzogen wird, um dadurch eine übermäßige Bioaktivierung von FGFs zu verhindern und das FGF/FGFR-*Signaling* mit der daraus resultierenden mitogenen Stimulation auf eine physiologische Wachstumskontrolle zu begrenzen. Harris *et al.* zeigten, dass die Regulation der FGF-BP-Expression einem stark durch MAP-Kinasen direkt transkriptionell regulierten Mechanismus unterliegt [155, 164, 311]. Der Transkriptioninhibitor Actinomycin D kann eine Hochregulation der FGF-BP-mRNA komplett unterbinden. Eine Hemmung der *de novo* Proteinsynthese⁴⁷ führt hingegen zu keiner Änderungen in der FGF-BP-Konzentration

46) Hiermit gemeint sind gentherapeutisch eingesetzte Nukleinsäuren (i.e.S. Antisense-Nukleinsäuren, Ribozyme und siRNAs/RNAi). Eine Ausnahme stellen Aptamere (*wörtlich*: „passende“ Teile) dar [309]. Diese *in vitro*-selektierten Nukleinsäuren binden ebenfalls in einer *direkten* Weise an ihr *target* und bremsen resp. inaktivieren es dadurch in seiner Funktion. Aptamere sind bereits in medizinischer Anwendung und als zugelassene Arzneimittel auf dem Markt [310].

47) Translationsblockade durch Cycloheximid-Chase-Assay.

[155]. Die Arbeitsgruppe folgert daraus, dass FGF-BP damit die Charakteristika eines *primary response*-Gens aufweist ([155], zur Übersicht [312]). Diese Ergebnisse werden durch die vorliegende Arbeit gestützt. Eine *in vitro* durchgeführtes, transientes FGF-BP-*targeting* mit siRNAs verringerte die Transkriptionsrate zwar um 40-70%, führte jedoch zu keiner Veränderung in der Proteinkonzentration. Selbst bei einer siRNA-Doppeltransfektion war der *knockdown* auf translationaler Ebene nicht im Western blot detektierbar. Beobachtungen von Liaudet-Coopman *et al.* stehen in Einklang dazu. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die FGF-BP mRNA relativ stabil ist und eine Halbwertszeit von >16h aufweist [171]. Dies kann als Erklärung dafür dienen, warum FGF-BP-abhängige *loss-of-function*-Phänotypen nur unter forciert langfristigen Bedingungen erkennbar waren. Bei den verwendeten stabilen Zelllinien klonaler Herkunft war auffällig, dass der RNAi-Vektor nicht dauerhaft im Genom verblieb. Wenngleich unmittelbar nach einer Transfektion mit anschließender Isolierung resistenter Klone der *knockdown* noch detektierbar war, so ließ sich die shRNA nach ~10 Passagen nicht mehr in den Zellen auffinden. Daraus ergibt sich, dass die permanente FGF-BP-Suppression für das Überleben einzelner Tumorzellen einen starken Selektionsnachteil darstellt. Mögliche Kontrollmechanismen der FGF-BP-Expression sowie Abhängigkeiten der Proteinkonzentration von Art und Beschaffenheit der Interaktionspartner werden im Folgenden näher diskutiert.

5.3 Komplexe Kontrollmechanismen: Regulation der FGF-BP-Expression durch Serum

Die Beobachtung, dass die FGF-BP-Expression einer starken Kontrolle durch Serum unterliegt, impliziert einen komplexen Mechanismus der Proteinsteuering. In der isolierten Zellkultur induziert der Entzug von Serum einen Mangel an (exogenen) Wachstumsfaktoren, wodurch die Weiterleitung mitogener Signale massiv beeinträchtigt wird. Folge einer serumfreien Kultivierung ist daher zumeist, dass eine Progression im Zellzyklus ausbleibt und die Zelle bei geringer metabolischer Aktivität solange im G₁-Restriktionspunkt verharret, bis die „Hungerperiode“ wieder aufgehoben wird (sog. *Silence-Phase*)⁴⁸. Somit kontrollieren die im Serum zahlreich vorkommenden Chemokine in hohem Maße das Proliferationsverhalten der Zellen. Dabei sind einzelne Komponenten des Serums in der Lage, bei einer Vielzahl von zellulären Genprodukten differentielle Änderungen in der Proteinexpression zu induzieren. Diese Serumabhängigkeit ist bereits umfangreich untersucht [314] und beispielsweise für humane Fibroblasten differenziert für eine Vielzahl an Genen bekannt [315]. So werden u.a. FGF2 und FGF7 durch FCS hochreguliert, und auch Komponenten, welche am Umbau der EZM (*Remodeling*) beteiligt sind, unterliegen einer durch Serum gesteuerten Kontrolle [314].

48) Insofern eignet sich diese Methode auch gut zum Synchronisieren von Zellkulturen (zur Übersicht [313]).

Auch für FGF-BP sind Serum-abhängige Änderungen in der Genexpression bekannt [155, 163]. Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien führten serumfreie Bedingungen zu einem zeitabhängig massiven Anstieg der FGF-BP mRNA. Dies widerspricht den Befunden von Harris *et al.*, da die Arbeitsgruppe eine Induktion der FGF-BP-Expression nach Serumzugabe ermittelte [155]. Allerdings unterscheiden sich dabei die experimentellen Bedingungen von denen für diese Arbeit etablierten. So erfolgte eine Normierung der FGF-BP-Expression auf zuvor serumgehungerte, post-mitotische Zellen und nicht auf proliferierende Kulturen. Die Genexpression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen unterliegt allerdings einer strengen Kontrolle mehrerer, teils voneinander unabhängiger Mechanismen und soll daher nur in Hinblick auf das hierbei untersuchte Modell diskutiert werden. Denkbar wäre, dass der länger andauernde Serumentzug zu einer Verknappung an extrazellulären FGF-Bindepartnern für FGF-BP führte. Da sich unter diesen wachstumsfaktorarmen Bedingungen eine transkriptionelle Zunahme der FGF-BP-Expression zeigte, könnten die Zellen möglicherweise kompensatorisch gegengesteuert und FGF-BP hochreguliert haben, um fehlende FGFs verstärkt zu mobilisieren (sog. Autostimulation). Eine solche autokrine Wachstumskontrolle wird beispielsweise bei SW-13-Zellen beobachtet. Im Weichagar bilden diese Zellen normalerweise keine Kolonien aus [316, 317]. Erst unter Einfluß exogener Stimulantien wie FGF2 [316] oder IL-1 [317] zeigen sie die Fähigkeit, kontaktunabhängig zu wachsen. Es ist beachtenswert, dass schon die Stimulation mit konditioniertem Medium unter serumfreien Bedingungen dazu ausreicht, diese Zellen im Weichagar wachsen zu lassen [318]. Natürlicherweise sind SW-13 FGF-BP-negativ. Dennoch fand man heraus, dass FGF-BP in dieser Zelllinie ein potenter koloniestimulierender Faktor ist, da ein durch Überexpression induziertes, verstärktes *Signaling* von endogenem FGF2 dazu ausreichte, um die oben erwähnte phänotypische Transformation herbeizuführen [152]. Auf translationaler Ebene wurde jedoch keine vermehrte Expressionsrate von FGF-BP unter serumfreien Bedingungen festgestellt. Es ist anzunehmen, dass ein durch Serumhunger induzierter Mangel an extrazellulären FGF-Bindepartnern zu einer raschen Degradation von FGF-BP führt. Darauf weisen ferner die Ergebnisse von *in vitro*-Stabilitätsassays aus dieser Arbeit hin, in welchen die Menge an wiederauffindbarem Protein bereits nach kurzen Inkubationszeiträumen signifikant reduziert ist. Jedoch bleibt bei diesen zellfreien Untersuchungen der protektive Einfluß durch die EZM unberücksichtigt. Da die Protein-Zellmatrix-Assoziation für FGF-BP ebenfalls einen wichtigen extrazellulären Pool darstellt, müssten zur weiteren Absicherung dieser Hypothese ergänzende Stabilitätsuntersuchungen in intakten Zellen durchgeführt werden.

5.4 Einfluß des Tet-*on*-Systems auf die Expression von shRNAs gegen FGF-BP

Ein Ziel dieser Arbeit war es, über die Reduktion der FGF-BP-Konzentration Untersuchungen zur Funktion des Proteins in Tumorzellen durchzuführen. Zu diesem Zweck wurde die Etablierung eines Tet-regulierbaren Gen-*Silencing*-Systems angestrebt. Die klonale Selektionierung sowie das *Screening* nach positiven Zellen mit induzierbarem *knockdown* gestaltete sich jedoch äußerst schwierig. Bei keiner der ~30 untersuchten monoklonalen Zelllinien konnte trotz intensiver Suche eine Dox-vermittelte Induzierbarkeit des shRNA-Promotors gefunden werden. Dennoch wurden in jedem Transfektionsansatz resistente Klone aufgefunden, welche (i) eine stabile shRNA-Produktion aufwiesen und (ii) eine deutliche, dauerhafte (konstitutive) Verminderung der FGF-BP-Expression zeigten. Die fehlende Regulierbarkeit der Genexpression durch das hierbei verwendete chemisch induzierbare shRNA-Expressionssystem soll im Folgenden näher diskutiert werden.

Das in dieser Arbeit verwendete shRNA-Expressionsplasmid pSingletTs basiert auf dem sog. Tet-*on*-System [319], welches bereits lange auf dem Gebiet der Genüberexpression etabliert ist. Es ermöglicht die rekombinante Produktion zahlreicher toxischer Proteine, welche unter konstitutiven Expressionsbedingungen nicht zu erhalten wären [320-322]. Dabei wird die Regulierbarkeit über das Tn10-Operon aus *E. coli* erreicht, welches natürlicherweise (u.a.) für die Resistenz gegenüber Tetracyclinen verantwortlich ist (zur Übersicht [323]). Der Vorteil einer steuerbaren RNAi ist, dass bei einer funktionierenden, streng reproduzierbaren Regulierbarkeit idealerweise keine Negativkontrolle notwendig ist, da der nicht-induzierte Zustand als direkte Vergleichsebene dient. Darüber hinaus ermöglicht ein solches System die Herunterregulation von Zielgenen, welche für das zelluläre Überleben der Zelle essentiell sind (z.B. Zellzyklus-Regulatoren oder Wachstumsfaktoren).

Bei genauerer Betrachtung des shRNA-Expressionsvektors wird ersichtlich, dass der Abschnitt, der für die Expression der katalytischen RNA kodiert, mit ~300 nt. vergleichsweise klein ist. Der Promotor ist kurz und liegt komplett stromaufwärts (*upstream*) von der zu regulierenden Sequenz. Desweiteren wird die shRNA-Expression streng über ein (ebenfalls heterolog eingebrachtes) Regulatorprotein kontrolliert, das in der Promotorregion der shRNA-Expressionskassette bindet und dadurch im nicht-induzierten Zustand den Promotor blockiert. Die konstitutive Expression dieses sog. Tet-Repressors (TetR) wird dabei durch dasselbe Plasmid kodiert, welches ebenfalls für die shRNA-Produktion verantwortlich ist. Als Folge der hohen räumlichen Nähe des *TetR*-Gens zum shRNA-Locus wäre es denkbar, dass eine gemeinsame Integration der Plasmid-Bestandteile ins Genom erfolgte und so keine voneinander unabhängige Regulation beider Genabschnitte mehr stattfand. So könnte eine übermäßig hohe Expression des TetR die Induzierbarkeit aufgehoben haben, da auch *nach* Zugabe einer definierten Mengen von Doxycyclin immer noch ausreichend TetR-Moleküle für eine Repression des Promotors

zur Verfügung stehen⁴⁹. In diesem Fall würden sich somit stabil-transfizierte hinsichtlich der FGF-BP-Expression vom Wildtyp nicht unterscheiden. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung des Doxycyclins war es jedoch nicht möglich, diese Hypothese zu bestätigen, da die für eine Derepression des Promotors nötige Dosis eskalation zu einer deutlichen Proliferationshemmung führte.

Unabhängig von der Doxycyclinzugabe wiesen dennoch einige Kolonien starke, permanent verringerte FGF-BP-Spiegel auf. Dies könnte auf eine partielle „Undichtigkeit“ (*Leakiness*) des Tet-regulierbaren Systems zurückzuführen sein. Diese *Leakiness* wurde im Zusammenhang mit einer Überexpression von Proteinen durch das Tet-*on* System bereits mehrfach beschrieben [324-327]. Übertragen auf die Tet-*on* vermittelte RNAi würde dies bedeuten, dass auch in Abwesenheit von Dox geringe Mengen einer shRNA transkribiert werden, welche (nach Prozessierung in siRNAs) den RISC beladen und dadurch zu dessen Absättigung führen. Die Folge wäre, dass eine zusätzliche, durch Dox induzierte shRNA-Produktion dann keinen weiteren *knockdown* mehr bewirken könnte. Darüber hinaus würde jedoch auch eine unzureichende Expression an TetR dazu führen, dass auch in Abwesenheit von Dox eine Transkription von shRNAs stattfindet, da hierdurch in der TATA-Box des Ziel-Promotors nicht mehr sämtliche Bindestellen belegt würden, um eine ausreichende Repression im nicht-induzierten Zustand zu bewirken. Lambeth *et al.* zeigten, dass bei einer vektorbasierten RNAi die Tet-gesteuerte Induzierbarkeit stark von der Anzahl der eingebauten Tetracyclin-Operator-Sequenzen (TetO) abhängt⁵⁰. Während eine TetO-Sequenz promotorunabhängig immer zu transkriptionellem „Hintergrund“ führt, ist bei zwei bis vier TetO-Abschnitten die Basalaktivität im nicht-induzierten Zustand hingegen sehr gering [328]. Der Anbieter des in dieser Arbeit verwendeten Vektors hat zwar sieben TetO-Sequenzen hintereinander geschaltet, und zusätzlich durch die Fusion des TetR mit einer KRAB-Silencer-Domäne [329] einen verstärkten Transaktivator generiert, um eine größtmögliche Suppression zu gewährleisten. Dennoch gibt es bis auf wenige Ausnahmen bisher kaum Publikationen, welche die Robustheit dieses Systems bestätigen, obwohl der Vektor bereits seit ~5 Jahren kommerziell zur Verfügung steht⁵¹.

In diesem Zusammenhang müssen außerdem weitere das System beeinflussende Faktoren näher betrachtet werden. Neben dem Aufbau der chemisch induzierbaren Expressionskassette ist ebenfalls die Art des Promotors wichtig für die Effektivität einer steuerbaren Genexpression. Nicht-virale vektorbasierte Systeme zur Produktion kurzer, nichttranslatierter Nukleinsäuren weisen als funktionellen regulatorischen Bestandteil zumeist entweder den H1- oder U6-Polymerase(Pol) III-Promotor auf. In dem in dieser Arbeit verwendeten Plasmid unterlag die shRNA-Expression der U6-Komponente,

49) Expressionslevel des TetR sind beispielsweise gut per Western blot zu quantifizieren.

50) Die TetO sitzt zwischen dem Promotor und dem „gene-of-interest“ (in diesem Falle der shRNA) und blockiert damit die Transkription.

51) Einzig in PubMed gefundene Publikationen mit pSingletTs: [330-333], Stand Juli 2010.

welche natürlicherweise ein wichtiger Bestandteil des Spleißosoms ist (zur Übersicht [334]). Zwar wurden Studien veröffentlicht, in welchen die U6-vermittelte Expression erfolgreich zur Produktion kurzer Oligonukleotide führte, jedoch waren dies mehrheitlich keine shRNAs. He *et al.* konnten beispielsweise eine valide Methode für eine U6-vermittelte Produktion von Antisense-Nukleotiden gegen EGFR etablieren [335] und Ohkawa *et al.* entwickelten ferner einen U6/Tet-regulierbaren cDNA-Antisense-Expressionsvektor [336]. Studien mit vektorbasierter RNAi basieren hingegen meist auf H1-gesteuerten Mechanismen. So zeigten Kappel *et al.*, dass der H1/Dox-gesteuerte *knockdown* von Plk1 im Mausmodell zu einem eindrucksvollen antitumoralen Effekt führt [337]. Die gleiche Arbeitsgruppe postuliert außerdem die Überlegenheit von H1-Transkripten gegenüber anderen, nicht-viralen Pol III-Promotoren, wie z.B. U6 [338]. Noonberg *et al.* stützen diese Hypothese, da sie herausfanden, dass U6-Transkripte auf zellulärer Ebene rasch inaktiviert werden können [339].

Der Nachweis, dass ein Tet-reguliertes RNAi-System in der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinie LS174T erfolgreich zur Verwendung kommen kann, wurde von van de Wetering *et al.* erbracht [340]. Dabei stand die induzierte shRNA-Expression jedoch ebenfalls unter Kontrolle des H1-Promotors. Darüber hinaus wurde die Regulierbarkeit über doppelt-stabile Zellen erreicht, um die Expression des TetR von der Tet-sensitiven Genkassette funktionell unabhängig zu machen. Das bedeutet, dass zwei durch unterschiedliche Selektionierungsprozesse voneinander getrennte Transfektionsvorgänge durchgeführt wurden, um die Induzierbarkeit zu etablieren.

Um die Funktionsweise des in dieser Arbeit verwendeten U6-Promotors besser zu verstehen, soll dieser im Folgenden näher beleuchtet werden. Bei dem U6-Promotor die Genaktivität von mehreren Faktoren abhängig, darunter sog. proximale Sequenz-Elemente (PSEs) [341], eine TATA-Box [342] sowie weitere DNA-bindende Proteine, welche für die Initiation der RNA-Polymerase notwendig sind ([343, 344], zur Übersicht [345-347]). Während auf Nukleinsäureebene die sog. *cis*-Elemente (*i.e.* Sequenzmotive) über entsprechende Klonierungen relativ leicht herstellbar sind, ist bei den sog. *trans*-Elementen⁵² immer eine individuelle Gewebeabhängigkeit zu berücksichtigen (zur Übersicht [201, 348, 349]). Das bedeutet, dass die Funktion des Promotors stark von der jeweiligen Zelllinie abhängt, in welcher er die Genaktivität steuern soll. In jeder Zelllinie herrschen jeweils voneinander abweichende Expressionslevel an Transkriptionsfaktoren und damit unterschiedliche regulative Bedingungen [350]. Dem U6-Promotor fehlt diese Gewebespezifität, da er innerhalb seiner strukturellen Komponenten keine Kontrollregionen (sog. ICRs, *intragene control regions*) aufweist [351]. Dies macht ihn somit zwar universell einsatzfähig, jedoch ist zu berücksichtigen, dass er

52) Sog. *trans-acting factors*, z.B. RNA-bindende Proteine, Transkriptionsfaktoren und miRNAs.

aufgrund seiner Stärke in den betroffenen Zellen meist zur Produktion von *high-level* Transkripten führt (zur Übersicht [352]). Grimm *et al.* beschrieben, dass eine U6-forcierte shRNA-Expression die zelleigene Genregulation durch endogene miRNAs massiv stört und dies *in vivo* zu Leberversagen mit letalem Ausgang führt [353, 354]. shRNAs entfalten, ebenso wie die strukturell und funktionell homologen körpereigenen miRNAs, ihre Wirkung im Zytoplasma der Zelle⁵³. Die Transkription findet hingegen im Zellkern statt. Um ihren Wirkort zu erreichen müssen die Nukleinsäuren daher die Kernmembran durchwandern. Bei diesem Vorgang konkurrieren beide Nukleinsäurespecies um denselben nukleären Exportmechanismus über Exp-5 [355-357]. Yi *et al.* konnten zeigen, dass eine forcierte, Pol III-vermittelte shRNA-Expression zur Absättigung von Exp-5 führt und dadurch die Aktivität der endogenen miRNAs unterbunden wird [358]. Dieser Effekt ist durch Überexpression von Exp-5 revertierbar und führt indessen zu einer gesteigerten RNAi [358].

Aus den oben genannten Gründen der Toxizität sowie fehlenden Steuerbarkeit zielen neuere shRNA-Expressionsstrategien auf die Verwendung von weniger starken Pol II-Promotoren ab [359-361]. Da miRNAs ebenfalls Transkripte der RNA-Polymerase II darstellen [362], wird auf diese Weise der natürliche Weg einer „endogenen RNAi“ besser nachempfunden. Pol II-Promotoren sind seit langem bekannt und umfangreich charakterisiert, (zeitlich) besser steuerbar als Pol III und lassen ferner eine gewebespezifische Wirkung zu (zur Übersicht [363]). Insofern sind für eine zukünftige Anwendung von validen Steuermechanismen weitere Optimierungen notwendig. Aus den genannten Gründen kann gefolgert werden, dass der hier zur Verwendung gekommene U6-Pol III-Promotor sich nicht für ein regulierbares RNAi-System in der Modellzelllinie LS174T eignet. Auch wenn das angestrebte Ziel, ein regulierbares System für eine vektorbasierte RNAi zu errichten, nicht erreicht wurde, konnten dennoch einzelne Zellklone ermittelt werden, welche eine konstitutive FGF-BP-Herunterregulation aufwiesen. Um die Spezifität der shRNA-vermittelten Effekte zu überprüfen, dienten neben den ursprünglichen parental Zellen eine Reihe von Kontrollen mit *unrelated* shRNAs, zum einen definierten Einzelzellkolonien entstammend, aber auch aus massentransfizierten Ansätzen, um die gewonnenen Ergebnisse abzusichern. Etwaige Störungen, welche durch ein mit Dox kontaminiertes Serum zu einer minimalen Basalaktivität des Tet-*on* Systems hätten führen können, wurden durch die Verwendung von Tet-*approved* FCS weitgehend ausgeschlossen.

53) Die endogene RNAi-Maschinerie ist zytosolisch lokalisiert.

5.5 FGF-BP als potentielles *target* in der Tumorthherapie: biologische Relevanz einer FGF-BP-Depletion

Der Ablauf von Zellwachstum sowie Zelluntergang erfolgt durch mechanistisch eng miteinander verknüpfte und teils überlappende Signalwege. Während sich die gesunde Zelle in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Mitose (=Wachstum) und Apoptose (=Zelluntergang) befindet, sind diese Steuerungen bei neoplastischen Vorgängen häufig dysreguliert (zur Übersicht [10, 364]). Da Krebszellen zumeist einen unkontrolliert schnellen Zellzyklus bei gleichzeitig gestörter Apoptoseregulation aufweisen, stellen die regulierenden Proteine beider Vorgänge attraktive Zielstrukturen in der Tumorthherapie dar (zur Übersicht [365]).

• FGF-BP und Proliferation

Die vorliegende Arbeit stützt die Ergebnisse von Aigner *et al.* [129], dass FGF-BP als Stimulus Zellen zur Teilung anregt und in den proliferativen Zellzyklus überführt. FGF-BP-reiche LS174T- sowie ME-180-Tumorzellen wuchsen nach der Herunterregulation deutlich langsamer als die jeweiligen parental Zellen. Umgekehrt hatte die heterologe Stimulation nicht-tumorigener COS-7-Zellen durch FGF-BP im Überexpressionsmodell eine proliferationsfördernde Wirkung, was bei der Ko-produktion mit dem wichtigen FGF-BP-Interaktionspartner FGF2 zu einem additiven Effekt führte.

Um diese Wachstumsstimulation von FGF-BP mechanistisch näher zu untersuchen, wurden konstitutiv herunterregulierte klonale Zelllinien mit unterschiedlich hohen Proteinrestgehalten FACS-Analysen unterzogen. Durch Ermittlung der phasenspezifischen Verteilung von LS174T konnte gezeigt werden, dass der *knockdown* von FGF-BP einen Arrest in der G₀/G₁-Phase auslöst und damit eine Verlängerung des Zellzyklus bedingt. Es stellte sich heraus, dass dabei das Kontrollprotein p21^{WAF1/CIP1} (=p21) beteiligt ist, da die zelluläre Konzentration dieses Zellzyklusprogressors in herunterregulierten Zellen deutlich erhöht war. Der negative Zellzyklusregulator p21 übt zumeist die Rolle eines Tumorsuppressors aus und wird als Folge von genotoxischen Einflüssen (z.B. DNA-Schädigung nach Bestrahlung) sowie zellulärem Streß (z.B. durch Zellgifte oder den Entzug von Wachstumsfaktoren) p53-abhängig hochreguliert^{54/55} [371, 372]. Auffällig war, dass die p21-Induktion unter den experimentellen Bedingungen offenbar unabhängig von p53 erfolgte, da sich im Vergleich zu den

54) LS174T *wz* haben zwei intakte Allele für p53 (+/+) [366, 367]. Ferner sind sie aneuploid (Karyotyp: 45, x. Ein x-Chromosom fehlt, sonst sind keine chromosomalen Aberrationen bekannt). Expression weiterer Onkogene: *myc* +; *myb* +; *ras* +; *fos* +; *sis* -; *abl* -; *ros* -; *src* - (Quelle: <http://www.cell-lines-service.de>).

55) In diesem Zusammenhang ist die doppelseitige Rolle von p21 erwähnenswert, da es Zell- sowie kontextabhängig neben einer Zelltod-fördernden Wirkung ebenfalls die Rolle eines als „*Survival*“-Faktors einnehmen kann, indem es beispielsweise an *pro*-Caspase 3 bindet und dadurch eine apoptotische Antwort inhibiert ([368, 369] zur Übersicht [370]).

Kontrollen keine Veränderungen im Aktivierungsmuster (Phosphorylierungsgrad) von p53 ergaben. Wenngleich der Mechanismus der *p21*-Induktion als Folge einer FGF-BP-Depletion mechanistisch bisher nicht erklärbar ist, so wurde eine von p53 entkoppelte p21-Aktivierung bereits mehrfach beschrieben [373-376]. Es bleibt festzuhalten, dass der antiproliferative Effekt eines FGF-BP-*knockdowns* u.a. auf einen Anstieg von aktiviertem p21-Protein zurückgeführt werden kann, wodurch der Zellzyklus von FGF-BP-herunterregulierten Zellen verlängert wird.

• FGF-BP und Apoptose

Da SW-13 zwar eine Reihe von FGFs, aber kein FGF-BP aufweisen [152], stellen diese Zellen ein gutes Modell dar, um FGF-BP-vermittelte Effekte näher zu analysieren. In vorangegangenen Untersuchungen konnte so beispielsweise nachgewiesen werden, dass die konstitutive Expression der humanen FGF-BP-cDNA diesen Zellen einen tumorigenen sowie angiogenen Phänotyp vermittelt und dass dieser Effekt FGF2-abhängig ist [152].

Während der Nachweis, dass FGF-BP den anti-apoptotischen Effekt von FGF2 verstärken kann, bereits erbracht ist [177], wurde der biologische Beitrag von FGF-BP als alleiniger Überlebensfaktor in einem humanen Modell bisher noch nicht untersucht. Mit dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass FGF-BP *selbst* eine anti-apoptotische Wirkung besitzt. Diese wurde aus der erhöhten Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in FGF-BP-depletierten LS174T-Zellen abgeleitet. In der Gegenprobe führten *Rescue*-Experimente mit FGF-BP-überexprimierenden SW-13 zu einer deutlichen Abnahme der intrinsischen Apoptoserate. Dies ist umso bemerkenswerter, als dass die schlechte Proteinexpression in stabil-transfizierten Zellen bereits mehrfach beschrieben wurde [48, 182]. Das gleiche *Rescue*-Experiment mit den natürlicherweise FGF-BP-reichen LS174T-Zellen zeigte hingegen keinen durch die Überexpression vermittelten spezifischen Effekt. Möglicherweise war der Apoptose-modulierende Beitrag des Proteins in einem nativ hoch-exprimierenden Zellmodell bereits maximal ausgereizt. Jedoch könnten ebenso die durch transiente Überexpression geschaffenen Bedingungen nicht dazu ausgereicht haben, um innerhalb der untersuchten Zeiträume die Ebene der Effektorcaspasen zu erreichen. Dies soll hierbei insbesondere berücksichtigt werden, da bislang nicht verstanden ist, inwieweit ein mechanistischer Zusammenhang zwischen FGF-BP-Expression und Caspaseaktivität besteht bzw. ob die Veränderungen im Apoptose-muster einem durch FGF-BP-Überexpression veränderten FGF-Signaling unterliegen. Es wäre daher denkbar, dass in diesem Modell spezifische Effekte möglicherweise erst nach einer längeren Adaptationsphase zu detektieren wären. Auf molekularer Ebene wurde in FGF-BP-depletierten LS174T eine erhöhte Konzentration der Zelltod-fördernden *BH3-only domain* Proteine Bad und Bax gefunden, was den apoptotischen Phänotyp dieser Zellen unterstreicht. Ebenfalls waren die TRAIL-Todes-rezeptoren DR4 und DR5 in *knockdown*-Zellen stärker aktiviert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des *Phospho*-MAPK-Arrays, welcher ergab, dass

unter *knockdown*-Bedingungen, parallel zu der Apoptose-Induktion, eine Repression des Akt/PKB-Weges erfolgte (Details s.u.).

• *FGF-BP und MAP- sowie Akt-Kinasen*

Bereits in vorangehenden Studien konnte gezeigt werden, dass FGF-BP in die zelluläre Signaltransduktion involviert ist und konzentrationsabhängig die FGF2-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 [158, 176, 177] sowie Akt [177] positiv moduliert. Ferner wurde ermittelt, dass eine Überexpression des positiven FGF-BP-Regulators KLF-5 eine Akt-Aktivierung zur Folge hat [159].

Akt-Kinasen wurden bei der Tumorigenese kolorektaler Karzinome mehrfach als relevante Onkogene beschrieben [377-380]. Auch die FGF-vermittelte Akt-Induktion ist bereits umfangreich untersucht (zur Übersicht [114]). Eine konstitutive Akt-Aktivierung kann zum einen auf Genamplifikationen im PIP3K-Weg beruhen⁵⁶, andererseits auf die Folge eines Verlustes bzw. einer Mutation des Tumorsuppressors PTEN zurückzuführen sein, welcher einen negativen Regulator in der PIP3K-Signaltransduktion darstellt (zur Übersicht [381]). Im zellulären *Survival-Signaling* spielen Akt-Kinasen eine entscheidende Rolle durch (i) Blockade von pro-apoptotischen Proteinen⁵⁷, (ii) Inhibition des SAPK/JNK-Pathways [383] sowie (iii) Antagonismus der *p21*-Induktion durch die Mdm2-p53-Achse⁵⁸ (zur Übersicht [385]).

Durch das *Phospho-Kinase-Screening* mit stabil shRNA-transfizierten LS174T Kolonkarzinomzellen wurde gezeigt, dass die Herunterregulation von FGF-BP zu einer Suppression von Akt führt. Dies steht in Einklang mit den Ermittlungen von Lee *et al.*, welche nach *knockdown* des FGF-BP-Homologen im Zebrafisch ebenfalls eine Deaktivierung von Akt ermittelten [139]. Desweiteren ergaben die Antibody-Arrays, dass der Zellzyklusprogressor p21, die MAP-Kinasen SAPK/JNK und die Effektorcasapase 3 abhängig von der FGF-BP-Expression aktiviert werden. Dies deckt sich mit den o.g. Wirkungen von Akt. Nach FGF-BP-*knockdown* war die zelluläre Konzentration von p21 erhöht, SAPK/JNK pan verstärkt und die Apoptoserate gesteigert.

Ein weiterer Gegenspieler von Akt im PI3K/Akt-Signaling ist die GSK3 (Glykogensynthase-Kinase 3). Akt fungiert als negativer Regulator der GSK3 und die Hemmung der GSK3 bedeutet eine gesteigerte Aktivität von β -Catenin ([386], zur Übersicht [387]). Es konnte gezeigt werden, dass unter *knockdown*-Bedingungen das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Kinasen präferentiell auf die Seite

56) Akt ist ein *downstream target* der PIP3K (Phosphatidylinositol-3-kinase), welche als Folge eines Wachstumsfaktor-induzierten *Signalings* durch RTKs aktiviert wird. Akt-Onkogene sind selbst relativ selten mutiert. Zumeist liegt eine Amplifikation sowie konstitutive Aktivierung von PIP3K vor.

57) Akt nimmt bei konstitutiver Aktivierung zumeist die Rolle eines Apoptoseinhibitors ein, indem es u.a. *pro*-Caspase 9 sowie Bad (=Bcl-2-Antagonist of Cell-Death) inaktiviert und damit den Austritt von Cytochrom c aus dem Mitochondrium in das Zytosol verhindert [382].

58) Dies gilt insbesondere für Akt1. Akt2 hingegen bindet an p21, wodurch dieses stabilisiert wird [384].

von GSK3 (hier: GSK3 β) verschoben ist. Dies stützt die Beobachtung, dass auch ein Entzug von Wachstumsfaktoren eine apoptotische Antwort der Zelle verursacht, welche auf einer verstärkten GSK3-Aktivität beruht (zur Übersicht [388]). Eine mögliche Ursache für diese Gleichgewichtsverschiebung zwischen den beiden Kinasen könnte in der verringerten Konzentration an freien FGFs liegen, welche aus einer Herunterregulation von FGF-BP resultiert. Ray *et al.* zeigten, dass *FGF-BP* eine Zielstruktur des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs darstellt [47]. Die Inhibition der GSK3 durch Lithium (Li⁺) führt zu einem starken Anstieg der FGF-BP-Spiegel in MDA-MB468-Zellen⁵⁹. Auch wenn die *FGF-BP*-Induktion durch β -Catenin nicht den Anstieg der GSK3 nach einer FGF-BP-Depletion erklären kann, so läßt dieser Sachverhalt dennoch auf gemeinsame Signalwege schließen.

- ***FGF-BP und zellulärer Redoxhaushalt***

In FGF-BP-herunterregulierten Zellen zeigte sich eine Dysbalance im Redoxstatus. In LS174T wurde nach dem *knockdown* von FGF-BP ein Absinken der Konzentration an zellulärer Katalase bei gleichzeitig erhöhten Spiegeln an HIF α detektiert. Dies soll im Folgenden näher ausgeführt werden.

Eine Reihe von biologischen Kompensationsmechanismen tragen dazu bei, dem verminderten O₂-Angebot im Tumorgewebe entgegenzuwirken (zur Übersicht [389]). So ist bekannt, dass hypoxische Bedingungen zu einer gesteigerten Expression pro-angiogener Wachstumsfaktoren führen, was die Neovaskularisierung resp. Angiogenese des Tumors fördert (Details siehe Abschnitt 1.3). Li *et al.* fanden heraus, dass bei einer induzierten Hypoxie Umbauprozesse in der Zellmatrix stattfinden und die Synthese von Heparansulfaten erhöht ist [390]. Die dadurch gesteigerte Anzahl an FGF2-Bindestellen bewirkt in hypoxischen Zellen HIF α -abhängig ein verstärktes FGF-Signaling [390]. Dieser Vorgang ist u.a. begleitet von einer erhöhten Aktivität der NDST-1 [390]. Da die Aktivität dieses Enzyms wiederum einen positiven Einfluß auf die FGF-BP-Expression ausübt [181], wäre denkbar, dass FGF-BP in diese autokrine Regulationsschleife [391] involviert ist.

Desweiteren wurden unter *knockdown*-Bedingungen Änderungen im Aktivierungsmuster der Akt-Kinasen ermittelt (Details s.o.). Da Akt-Kinasen auch in die Regulation des zellulären Redoxgleichgewichts eingreifen, soll das gefundene Ergebnis nachfolgend im Zusammenhang mit dem „dualen“ Signaling von Akt diskutiert werden. Neben der etablierten Funktion von Akt als *Survival*-Faktor stellten Nogueira *et al.* unlängst eine Verbindung zwischen Akt-Aktivierung und Apoptose-Induktion her (sog. Akt-induzierter, ROS-getriggelter Zelltod ([392], zur Übersicht [393]). Die Arbeitsgruppe zeigte, dass Tumorzellen mit Akt-Hyperaktivierung, bedingt durch einen vermehrten O₂-Verbrauch

59) MDA-MB468 weisen eine intakte β -Catenin-Regulation auf. Dieser durch Li⁺-induzierte Regelkreis muss in LS174T jedoch nicht zwangsläufig nachweisbar sein, da LS174T zwar APC (+/+) sind, jedoch eine Mutation im *CTNNB1*-Gen tragen, was zu einer konstitutiven β -Catenin-Aktivität führt [42]. Da *FGF-BP* ein direktes *target*-Gen von β -Catenin ist [47], stellt dies einen möglichen Grund für die starke Überexpression von FGF-BP in dieser Zelllinie dar.

(Anstieg der oxidativen Phosphorylierung), besonders empfänglich auf oxidativen Streß reagieren und infolgedessen in Apoptose gehen. Mechanistisch führt ein übermäßiges PI3K/Akt-Signaling zur Inhibition von FoxO-Transkriptionsfaktoren, wodurch wiederum die Expression antioxidativer Enzyme⁶⁰ vermindert wird (zur Übersicht [394]). In der Folge kommt es zu einer vermehrten intrazellulären Akkumulation von reaktivem Sauerstoff (ROS), was eine selektive Empfänglichkeit Akt-überexprimierender Zellen für pro-apoptotische Vorgänge zur Folge hat⁶¹

Zum einen wurde in FGF-BP-herunterregulierten Zellen eine im Vergleich zu den Kontrollen partielle Deaktivierung von Akt gemessen. Andererseits war in den *knockdown*-Zellen die zelluläre Katalasekonzentration erniedrigt. Die ermittelten Daten demonstrieren, dass FGF-BP bei proliferativen sowie zytoprotektiven Vorgängen in ein komplexes molekulares Netzwerk eingebunden ist. In ME-180 ist dieser Sachverhalt dadurch feststellbar, dass eine Behandlung von *knockdown*-Zellen mit unterschiedlichen Zytostatika keine gleichgerichtete Wirkung erzielte und, abhängig vom Wirkmechanismus, zu teils erhöhter und teils erniedrigter Sensitivität gegenüber den antitumoralen Pharmaka führt. Ein Wirkmechanismus von Zytostatika ist auf die Erzeugung von ROS zurückzuführen und das Ausmaß der ROS-induzierten Zellschädigungen hängt u.a. von der zellulären Konzentration an detoxifizierenden Enzymen ab. Es ist beschrieben, dass resistente Tumorzellen die normalerweise nur intrazellulär vorkommende Katalase ebenfalls in der EZM anreichern und dadurch auch extrazellulär freie Radikale abfangen können [396, 397]. Dies stellt einen möglichen Resistenzmechanismus gegenüber ROS-erzeugenden Zytostatika dar und könnte für die in ME-180-Zellen durchgeführten Untersuchungen möglicherweise eine Rolle spielen, da bei einer Herunterregulation von FGF-BP Veränderungen in der Chemosensitivität beobachtet wurden.

• FGF-BP und Sensitivität gegenüber Zytostatika

Um mögliche kooperative Effekte einer Anwendung gängiger Tumortheraeutika in Kombination mit einem FGF-BP-*targeting* zu untersuchen, wurden klonale ME-180-Zellen mit unterschiedlich hohen Proteinkonzentrationen in Viabilitäts-Assays miteinander verglichen (Chemosensitivität im *in vitro* Modell)⁶². Als Parameter für die Zytotoxizität der Wirkstoffe wurde die Überlebensrate der Zellen nach einer Antitumorbehandlung gemessen. So konnten substantielle Unterschiede in der Chemosensitivität der Zervixkarzinomzellen in einer Abhängigkeit von der FGF-BP-Expression ermittelt werden. Bei allen Experimenten wurden die applizierten Wirkstoffmengen unter Berücksichtigung einer Dosis-escalation von mindestens 2 Logstufen über die letale Konzentration hinaus gewählt, um den typischen sigmoidalen Zusammenhang zwischen Zytotoxizität und Viabilität zu erhalten. Bei der

60) Sog. ROS-„Scavenger“, beispielsweise Katalase, GST (Glutathion-S-Transferase) oder SOD (Superoxiddismutase).

61) Eine Übersicht über die erhöhte Seneszenz unter hypoxischen Bedingungen findet sich bei Campisi *et al.* [395].

Durchführung solcher Modellstudien muss berücksichtigt werden, dass ein Gewebeverband *in vivo* natürlicherweise aus einer Vielzahl asynchroner Zellpopulationen besteht. In der onkologischen Praxis geht daher der spezifischen Behandlung häufig eine Synchronisationstherapie mit Zellzyklus-arretierenden Pharmaka voraus, welche einen Großteil der entarteten Zellen kollektiv in einer definierten Zyklusphase anreichert und den Tumor für eine nachfolgende Therapie besonders empfänglich macht. Auf diese Weise kann eine zielgerichtete Kombination von aufeinander abgestimmten Wirkstoffen bzw. Strahlenapplikationen eine maximale toxische Wirkung hervorrufen, bei vergleichsweise geringer Dosierung. Einen besonderen Nutzen erfahren bestehende Therapieansätze insbesondere dann, wenn jene Parameter ermittelt werden können, welche für die Resistenz gegenüber Zytostatika verantwortlich sind. Die Ribozym-transfizierten Zellen stellten hierbei eine gute Möglichkeit dar, diese Fragestellung in einer FGF-BP-Abhängigkeit zu untersuchen. Aus den o.g. Gründen wurden bei den durchgeführten Untersuchungen ausschließlich nicht-synchronisierte Zellen verwendet, da so die natürliche Situation im Tumorgewebe besser nachgeahmt werden konnte.

Während die biologischen Wirkungen von FGFs hinsichtlich einer Ausbildung von Resistenzen in Neoplasien in zahlreichen Studien untersucht wurden (zur Übersicht [118])⁶³, ist über die Rolle von FGF-BP diesbezüglich bisher wenig bekannt. Die in der vorliegenden Promotionsarbeit erhaltenen Daten belegen, dass FGF-BP stark in den zellulären Ablauf von Proliferation und Zelltod involviert ist. Zum einen wurde festgestellt, dass ein FGF-BP-*targeting*, d.h. die stabile Herunterregulation des *FGF-BP*-Gens, das Wachstum von Tumorzellen deutlich reduziert. Andererseits bedingt eine Herunterregulation von FGF-BP jedoch *nicht* zwangsläufig eine allgemeine Erhöhung der zellulären Sensitivität gegenüber antitumoralen Wirkstoffen. Der antiproliferative Effekt eines FGF-BP-*knockdowns* kann daher nicht als alleinige Erklärung für das veränderte Ansprechverhalten dieser Zellen gegenüber Chemotherapeutika dienen, da bei den untersuchten Wirkstoffen zwischen *knockdown* und nachfolgender Sensitivität kein genereller Zusammenhang (im Sinne einer einheitlichen Therapie-*Response*) beobachtet wurde. Vielmehr lassen die gefundenen Ergebnisse den Schluß zu, dass für FGF-BP-regulierte Zellen eine Wachstumsphasen-abhängige Empfänglichkeit gegenüber Chemotherapeutika besteht.

Gegenüber den Zellzyklus-arretierenden Spindelgiften Docetaxel⁶⁴ und Vinorelbin wurde bei den Ribozym-transfizierten ME-180-Zellen eine inverse Korrelation zwischen FGF-BP-Expression und Chemoresistenz festgestellt. In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen mit LS174T-Zellen konnten zeigen, dass die Herunterregulation von FGF-BP einen Wachstumsarrest induziert und

62) ME-180 haben zwei intakte Allele für p53 (+/+) [398].

63) Insbesondere bei FGF-2 wurden dabei teils widersprüchliche Ergebnisse bezüglich einer Ausbildung von Resistenzen gegenüber Antitumormitteln gefunden (zur Übersicht [399]).

64) In ME-180 ist Docetaxel *in vivo* als auch *in vitro* das wirksamste Taxan [400].

dadurch der Zellteilungsprozeß unterbrochen wird. Dieser antiproliferative Effekt, der sich auf einen Anstieg von Populationen in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus zurückführen läßt, könnte als Erklärung dafür dienen, warum nicht-synchronisierte, FGF-BP-depletierte Klone von einem Zytostatika-induzierten Arrest im G_2/M -Checkpoint nicht so stark betroffen sind wie parentale Zellen. Da der *knockdown*-Phänotyp im Zellzyklus länger braucht, um das Teilungsstadium zu erreichen, ist er von der Zyto-toxizität der Spindelgifte möglicherweise weniger stark betroffen als der Wildtyp. Den herunter-regulierten Zellen verbliebe somit ein größeres „zeitliches Fenster“ in der Interphase, um Entgiftungsreaktionen durchzuführen⁶⁵ oder Effluxpumpen zu aktivieren und dadurch die Toxizität der Zellgifte abzumindern. Bei der Etablierung einer Cisplatin-resistenten ME-180-Subzelllinie wurde beispielsweise eine verstärkte Expression des *MDR1*-Gens für P-gp beobachtet [401]. Da die Wirkstoffe Docetaxel und Vinorelbin ebenfalls Substrate für den ABCB1-Transporter sind (zur Übersicht [402]), könnte dies bei der Behandlung der Zellen mit Spindelgiften einen möglichen Resistenzfaktor darstellen.

Bei Irinotecan war bei den *knockdown*-Zellen eine deutlich erhöhte Sensitivität zu beobachten. Die gedankliche Ausweitung der Ergebnisse der in dieser Arbeit *in vitro* durchgeführten Studie auf *in vivo*-Vorgänge bei Gebärmutterhalskrebs läßt die Folgerung zu, dass durch ein *Screening* der FGF-BP-Menge bestimmte Subgruppen definiert werden könnten, welche von einer gegebenen Zytostatikatherapie besonderen Nutzen erzielen. So würden beispielsweise Patienten profitieren, welche unter Behandlung mit dem Topoisomerasehemmer stehen, sofern die FGF-BP-Konzentration im Tumor erniedrigt ist. Die dabei ermittelte 5-fache Reduktion der IC_{50} durch einen FGF-BP-*knockdown* ist gerade in Hinblick auf das UAW-Profil dieses Wirkstoffs (Diarrhoe, cholinerges Syndrom, Myelosuppression) besonders beachtenswert. So wäre es möglich, bei *low abundance* von FGF-BP eine spezifische, niedrigdosierte Wirkstoffapplikation durchzuführen, ohne dabei die toxischen Nebenwirkungen zu verstärken. Aber auch ein therapeutisches Gen-*targeting* für FGF-BP in Kombination mit einer Irinotecan-Gabe wäre eine Möglichkeit, den Tumor gezielt zu behandeln. Wenngleich Irinotecan in der Therapie des Zervixkarzinoms nicht zu den *first-line* Chemotherapeutika zählt (zur Übersicht [403]), so wird es als Bestandteil des FOLFIRI-Regimes standardmäßig bei der Behandlung des kolorektalen Karzinoms eingesetzt (mit oder ohne die Kombination mit Cetuximab [404]). Da eine FGF-BP-Überexpression bei CRC mehrfach beschrieben wurde [47, 48, 130, 147, 151], ist Irinotecan damit ein relevanter FGF-BP-abhängiger Wirkstoff.

Bei den vom Zellzyklus-unabhängigen Wirkstoffen Oxaliplatin und Epirubicin zeigten sich unter den experimentellen Bedingungen keine Veränderungen in der Chemosensitivität. Um potentielle synergistische Ansatzpunkte aufzufinden sind diesbezüglich daher weitere Studien notwendig. So wäre

65) Beispielsweise über das Glutathion-Redoxsystem GSH (Thiol)-GSSG (Disulfid).

es gegebenenfalls möglich, dass ein vom Wildtyp abweichendes Ansprechverhalten herunterregulierter Zellen erst nach einer gezielten Vorbehandlung ersichtlich würde.

5.6 Neue FGF-BP-Bindepartner und Ausweitung der biologischen Funktion von FGF-BP

• Extrazelluläre Funktion von FGF-BP

Die Funktionsweise von extrazellulär vorliegendem FGF-BP besteht darin, eine reversible Protein-Protein-Interaktion mit Fibroblasten-Wachstumsfaktoren einzugehen und diese dadurch zu mobilisieren. Durch die Bindung an FGF-BP werden die FGFs aus der extrazellulären Matrix (EZM) freigesetzt und zu ihrem Wirkort, dem FGFR transportiert. FGF-BP spielt somit eine wichtige Rolle in der Bioaktivierung von FGFs, insbesondere während der Wundheilung, dem Tumorwachstum und der Angiogenese. Jedoch ist bisher nur zum Teil analysiert, welcher Vertreter aus der heterogenen FGF-Proteinfamilie im Einzelnen eine direkte Wechselwirkung mit FGF-BP eingeht [128, 129, 133, 163]. Ziel der durchgeführten Bindungstests war daher, weitere FGF-Bindepartner zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden in zellfreien *in vitro*-Assays (Liganden-Dot blot) die zu testenden FGFs mit mehreren FGF-BP-Proben inkubiert und die proteinchemischen Eigenschaften der unterschiedlich hergestellten rekombinanten Proteine hinsichtlich Bindeaktivität miteinander verglichen. Mit dieser Methode konnte erstmals gezeigt werden, dass über die bereits bekannten Wechselwirkungen zwischen FGF-BP und FGF1⁶⁶, -2, -7, -10 und -22 hinaus, weitere FGF-Bindepartner existieren. *E. coli* FGF-BP interagiert mit FGF4 sowie FGF8. Die Wechselwirkung zu FGF4 war jedoch nicht bei den in *P. pastoris* sowie Sf-9-Zellen hergestellten Proteinen zu beobachten. Aufgrund struktureller Unterschiede (z.B. Glykosylierungsmuster) von in Bakterien und in Hefen bzw. Insekten hergestellten Proteinen ist zu erwarten, dass die in den letztgenannten Systemen hergestellten Proteine wahrscheinlich in einer für Säugerzellen spezifischeren Struktur vorlagen als bakterielles FGF-BP. Da jedoch die verwendeten FGFs ebenfalls „nur“ bakterieller Herkunft waren, kann angenommen werden, dass auch die eingesetzten *bait*-Proteine ebenfalls nicht korrekt posttranslational modifiziert sind. Dies kann die Bindeaffinität beeinträchtigen. Die fehlende Interaktion zwischen *P. pastoris*- sowie Sf-9-Proteinen mit den FGFs lässt sich vermutlich damit erklären, dass der FGF-BP-Gehalt der Proben aus eukaryotischen Wirtssystemen eine geringere Proteinkonzentration aufwies als die der Testlösung mit *E. coli* FGF-BP.

66) Lediglich die Original-Arbeit von Wu *et al.* [128] beschreibt die Interaktion von FGF-BP mit FGF1. Lametsch *et al.* hingegen konnten diese Wechselwirkung ebenfalls nicht bestätigen [133]. Tassi *et al.* zeigte jedoch, dass die kompetitive Zugabe von FGF1 eine Bindung von FGF-BP an FGF2 komplett inhibiert, was den Schluß einer Protein-Protein-Interaktion nahelegt [176].

• Intrazelluläre Funktion und Kernlokalisation von FGF-BP

Die nukleäre Lokalisation von FGF2 wurde bereits in mehreren Studien umfangreich untersucht (zur Übersicht [405]). Durch den Nachweis der Interaktionen von FGF2 mit FIF (*FGF2 Interacting-factor*, syn. Api-5, *Antiapoptotic protein 5*) wurde beispielsweise ein relevanter FGF2-Bindepartner im Zellkern beschrieben [406]. Die Interaktion von FGF2 zu FGF-BP hingegen wurde bislang nur in Hinblick auf eine rein extrazelluläre Funktionsweise untersucht. Abuharbeid konnte jedoch zeigen, dass bei der Koexpression von FGF2 mit FGF-BP eine Translokation beider Proteine in den Zellkern stattfindet [182]. Dies läßt den Schluß zu, dass auch FGF-BP eine intrazelluläre Funktion ausübt. Darauf aufbauend wurde in der vorliegenden Dissertation nach weiteren nukleären Interaktionspartnern für FGF-BP gesucht. Vorarbeiten, welche unter Verwendung der *Phage-Display*-Technik Hinweise auf eine mögliche Bindung an HMGA lieferten, konnten hierbei bestätigt werden. Dazu wurde HMGA rekombinant exprimiert und gereinigt. Da klassische Testsysteme zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen (Ko-Immunpräzipitationen sowie *Pulldown*-Assays) bei FGF-BP bisher immer äußerst schwer durchführbar waren⁶⁷, wurde über Far-Western blotting mit radioaktiv markierten Proteinen eine direkte, sensitive Nachweismethode gefunden, um die Interaktion von FGF-BP mit HMGA zu belegen. Ausgehend von der Interaktion zwischen FGF-BP und dem DNA-assoziierten Regulatorprotein HMGA wurde im Rahmen dieser Dissertation eine Bindung von FGF-BP an DNA postuliert und näher untersucht. Bedingt durch die basische Natur von FGF-BP (pI 9,3) ist eine solche Interaktion an negativ geladene Strukturen allein durch elektrostatische Triebkräfte denkbar. Auf extrazellulärer Ebene ist die Affinität von FGF-BP zu polyanionischen Verbindungen wie beispielsweise Heparin eindeutig belegt [132, 144]. Die Stabilitäts-Assays konnten zeigen, dass der Zusatz von Nukleinsäuren zu Testlösungen mit rekombinantem FGF-BP sich protektiv auf die Stabilität des Proteins auswirkt. Um die Spezifität der Protein-DNA-Wechselwirkung abzusichern, wurde nachgewiesen, dass diese DNA-vermittelte Proteinestabilisierung infolge eines enzymatischen Abbaus der DNA (DNase-Verdau) wieder aufgehoben wird⁶⁸. Dabei war die Herkunft der Nukleinsäuren von nachgeordneter Bedeutung, da auch für Säugerzellen unspezifische Sequenzen eines bakteriellen Plasmids wirksam waren, um den Degradationsprozeß zu verzögern.

67) Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde intensiv nach Möglichkeiten für die Bildung eines FGF-BP-Immunkomplexes gesucht, alle Versuche blieben aufgrund der Instabilität des Proteins jedoch ohne Erfolg. In einigen Studien haben Immunpräzipitationen mit FGF-BP bzw. FGF-BP-Fusionsproteinen hingegen funktioniert (siehe [130, 175, 181]).

68) Diese Stabilitätsuntersuchungen wurden mit unterschiedlichen Detektionsantikörpern durchgeführt. Bei dem Einsatz von Antikörpern gegen Epitop-tags war der Effekt der Proteinabnahme nur relativ schwach ausgeprägt im Vergleich zu Immunreaktionen mit FGF-BP-spezifischen Antikörpern. Dies ist damit zu begründen, dass eine kurze terminale Peptid-Sequenz (=kontinuierlicher tag) über die Inkubationsdauer hinweg relativ stabil bleibt und auch nach Degradation des Gesamtproteins noch von den Antikörpern erkannt wird.

- **Instabilität von FGF-BP**

Untersuchungen von Abuharheid ergaben, dass bei der Koexpression von FGF-BP mit FGF2 das *full length* Protein sowie C-terminale Verkürzungen in den Zellkern translozieren [182]. Diese nukleäre Komponente von FGF-BP geht mit fehlendem N-Terminus jedoch wieder verloren (N-terminale Verkürzungen sind zytosolisch lokalisiert). Unter der Annahme, dass zwischen Kernlokalisierung und DNA-Bindung ein direkter Zusammenhang besteht, wäre es plausibel zu folgern, dass die mögliche DNA-Interaktionsdomäne im N-terminalen Bereich des Proteins liegt. Unter Berücksichtigung dieses Zusammenhangs ließen sich so die unterschiedlich hohen Ausbeuten bei der rekombinanten Expression einzelner Deletionsmutanten erklären. Die Produktion N-terminal verkürzter FGF-BP-Konstrukte war nahezu unmöglich, C-terminale Verkürzungen waren hingegen relativ leicht erhältlich. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei den einzelnen Aufschluß- sowie Reinigungsschritten während der Proteinaufarbeitung immer auch geringe Mengen an DNA als Kontaminanten mit anwesend waren, ist anzunehmen, dass FGF-BP durch eine Bindung an Nukleinsäuren während und nach der Probenaufarbeitung stabilisiert wurde. Ein Verlust an putativ DNA-bindenden Bestandteilen ginge folglich einher mit einer geringeren Proteininstabilität. Diese Annahme deckt sich mit der Beobachtung, dass die nukleär lokalisierte Proteinfraction genau den Teil von FGF-BP darstellt, welcher bei der rekombinanten Expression gut zu erhalten war. Abuharheid geht bezüglich der Kolo-kalisation von FGF-BP mit FGF2 in den Zellkern von einer Protein-Protein-Interaktion aus, deren FGF2-Binde-domäne im N-terminalen Abschnitt von FGF-BP liegt, da nur bei Vorhandensein des Aminoterminus beide Proteine gemeinsam im Zellkern nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu stehen jedoch Untersuchungen von Xie *et al.*, welche die für eine Wechselwirkung von FGF-BP mit FGF2 minimal notwendige Interaktionsdomäne im C-Terminus von FGF-BP ermittelten [175]. Die Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus zeigen, dass allein der carboxyterminale Proteinbereich für ein funktionierendes, FGF-BP-vermitteltes FGF-Signaling ausreichend ist [175]. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Effekte, welche sich aus dieser Interaktion ergeben, ausschließlich unter Berücksichtigung einer extrazellulären Funktionsweise von FGF-BP (*i.e.* Aktivierung des FGFR) ermittelt wurden. Die nukleär lokalisierten Proteine blieben bei den Untersuchungen unberücksichtigt.

Zusammenfassend bekräftigt die vorliegende Arbeit die Hypothese einer intrazellulären Funktion von FGF-BP. Es wurde ein DNA-assoziiertes Kernprotein, HMGA, als neuer Interaktionspartner für FGF-BP ermittelt. Ferner konnte erstmals gezeigt werden, dass Nukleinsäuren FGF-BP vor einer Degradation schützen. Die Affinität von FGF-BP zu Nukleinsäuren ist vermutlich Kofaktor-unabhängig, da in isolierten *in vitro*-Assays keine weiteren Zusätze notwendig waren, um einen proteinstabilisierenden Effekt durch DNA nachzuweisen. Durch Ermittlung der Interaktion von FGF-BP mit nukleären Komponenten wird der bisher bekannte Wirkmechanismus des Proteins erweitert. Expressionsanalysen deckten instabile Proteinabschnitte auf, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen den schwer zu exprimierbaren Proteinabschnitten und DNA-Bindung angenommen werden kann.

6 Zusammenfassung

Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGFs) spielen eine bedeutende Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung. Bei neoplastischem Wachstum fungieren FGFs als potente Mitogene. Einige der tumorrelevanten FGFs binden jedoch mit hoher Affinität an eine oder mehrere Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) und die Freisetzung der FGFs aus der EZM stellt einen kritischen Schritt in der FGF-Bioaktivierung dar. Das FGF-bindende Protein FGF-BP ist ein sekretiertes Heparin-bindendes Protein, welches mit mehreren FGFs, wie FGF1, FGF2, FGF7, FGF10 sowie FGF22, spezifisch interagiert und diese aus ihrem extrazellulären Speicherort freisetzt. FGF-BP ist in verschiedenen Tumoren, insbesondere in der frühen Phase der Karzinogenese, hochreguliert. Die (Über-)expression von FGF-BP in Tumorzellen stellt einen limitierenden Faktor für die Etablierung solider Tumore dar.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene *knockdown*-Strategien exploriert um FGF-BP hinsichtlich seines Beitrags zu Proliferation und Apoptose sowie zum *in vivo*-Tumorstadium zu untersuchen. Unter Verwendung von vektorbasierter RNAi wurden isogene Kolonkarzinom-Zelllinien mit permanent vermindertem FGF-BP-Level generiert. Es wurde gezeigt, dass die Reduktion der FGF-BP-Level sowohl antiproliferative Effekt als auch pro-apoptotische Effekte hervorruft. Die Herunterregulation von FGF-BP ging einher mit komplexen zellulären und molekularen Veränderungen, u.a. in der MAPK- und Apoptose-Signaltransduktion. Im Vergleich zu den parentalen Zellen wies der *knockdown*-Phänotyp erhöhte Spiegel an aktiviertem Bad und Bax auf, was zu einer gesteigerten Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 führte. Gleichzeitig wurde in FGF-BP-herunterregulierten Zellen eine Suppression von Akt Kinasen, eine Aktivierung von SAPK/JNK und eine Induktion der GSK3 β detektiert. Klone mit vermindertem FGF-BP-Gehalt akkumulierten vermehrt in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus und wiesen erhöhte Konzentrationen an aktiviertem p21^{WAF1/CIP} auf. Darüber hinaus zeigten diese *loss-of-function*-Mutanten Alterationen im Redoxstatus auf, was sich in einer erniedrigten Katalasekonzentration sowie erhöhten Konzentrationen an HIF1 α widerspiegelte. In einem Zervixkarzinom-Modell wurde mit Hilfe eines Ribozym-*targetings* gezeigt, dass FGF-BP die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika beeinflusst. Synergistische Effekte eines *knockdowns* und einer Antitumorbehandlung waren nachweisbar bei dem Topoisomerase I Inhibitor Irinotecan, nicht aber bei den Spindelgiften Docetaxel und Vinorelbin.

In einem *in vivo*-Experiment gelang es, mit Hilfe einer auf Polyethylenimin (PEI) basierenden Applikation von therapeutischen Nukleinsäuren (FGF-BP-siRNAs) einen spezifischen FGF-BP-*knockdown* sowie einen antitumoralen Effekt im Kolonkarzinom-Nacktmausmodell zu erzielen.

Um neue Interaktionspartner für FGF-BP aufzufinden, wurden unterschiedliche *full length*- sowie Deletionsmutanten des Proteins kloniert und rekombinant exprimiert. Durch Protein-Protein-Interaktions-Analysen konnten weitere Liganden für FGF-BP innerhalb der FGF-Familie ermittelt werden (FGF4, FGF8). Darüber hinaus wurde das DNA-assoziierte *High-Mobility Group A*-Protein (HMGA) als neuer Bindepartner für FGF-BP identifiziert. Ferner zeigten *in vitro*-Untersuchungen eine Affinität von FGF-BP zu Nukleinsäuren. In Anwesenheit von genomischer DNA wies FGF-BP eine erhöhte Proteinstabilität auf. Diese Daten unterstützen die Hypothese eines erst kürzlich ermittelten und bislang noch nicht näher untersuchten intrazellulären Mechanismus von FGF-BP.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass FGF-BP bei proliferativen sowie zytoprotektiven Vorgängen in ein komplexes molekulares Netzwerk eingebunden ist. Die in dieser Arbeit ermittelten Daten demonstrieren, dass eine gezielte Verminderung der FGF-BP-Expression das Ausmaß der zellulären Apoptose erhöht, eine anti-proliferative Wirkung hervorruft und das Tumorwachstum *in vivo* vermindert. Die beschriebenen Untersuchungen zur Chemoresistenz erlauben eine Abschätzung der selektiven Sensitivität von Tumorzellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika in Abhängigkeit von der FGF-BP-Expression. Es kann somit gefolgert werden, dass FGF-BP ein vielversprechendes Zielmolekül (*target*) in der Antitumorthherapie darstellt.

7 Summary

Fibroblast growth factors (FGFs) are important regulators of cell proliferation and differentiation. In neoplastic growth, they act as powerful mitogens inducing cell migration and invasion. Since some cancer-relevant FGFs are tightly bound to the extracellular matrix (ECM), their release is one of the critical steps in FGF bioactivation. The FGF-binding protein (FGF-BP) is a secreted, heparin-binding protein that interacts with certain FGFs, releasing them from their extracellular storage. Hence, FGF-BP plays a significant role in FGF bioactivation. It has been shown to interact non-covalently with FGF1, FGF2, FGF7, FGF10 and FGF22. FGF-BP is upregulated in several tumors and it is associated in particular with early stages of tumor formation, where angiogenesis plays a critical role. In a nude-mouse model FGF-BP is a rate-limiting factor in tumor growth.

In this thesis, various knockdown strategies were explored to examine the contribution of FGF-BP to proliferation and apoptosis. By means of vector-based RNAi, isogenic colon carcinoma cell lines with permanently reduced FGF-BP levels were generated. It was shown that depletion of endogenous FGF-BP exerts anti-proliferative as well as pro-apoptotic effects in tumor cells. By selection of several clones with a robust gene *knockdown*, a dose-dependence of cell proliferation and apoptosis on the FGF-BP expression was established. To address the underlying cellular and molecular mechanisms in more detail, a variety of methods including flow cytometry, protease assays and Western blotting were employed. Compared to the parental cells the knockdown-phenotype exhibited distinct changes in cellular survival-, MAPK- and apoptosis signalling. FGF-BP downregulation induced increased levels of BH3-only domain proteins Bad and Bax, leading to enhanced Caspase 3/7 activity. In parallel, suppression of Akt kinases, activation of SAPK/ JNK and increased levels of GSK3 β were detected. Alterations in the cell cycle distribution upon knockdown of FGF-BP with a marked increase of cells in the G₀/G₁-Phase could be demonstrated by FACS analysis. Additionally, upregulation of p21^{WAF1/CIP1} protein and cell cycle prolongation were observed. Furthermore, these loss-of-function mutants showed alterations in O₂ consumption and in the redox status. Antibody arrays revealed increased levels of HIF1 α and downregulation of catalase, indicating an impaired protection of cancer cells against oxidative stress upon depletion of FGF-BP. In a cervical cancer model it could be demonstrated that ribozyme-mediated reduction of FGF-BP led to altered sensitivities towards certain anticancer drugs. Synergistic effects of FGF-BP knockdown and chemotherapy were observed in the case of the topoisomerase I inhibitor irinotecan but not for microtubule-interfering agents emphasizing the cell cycle phase dependency of FGF-BP action.

Beyond these *in vitro* experiments, an RNAi-based treatment study for therapeutic inhibition of FGF-BP *in vivo* was performed. Through polyethylenimine-based polymeric nanoparticles, siRNA-delivery was achieved that resulted in a specific FGF-BP knockdown and tumor-inhibiting effects in an *s.c.* colon carcinoma model.

In order to screen for novel binding partners of FGF-BP, full-length FGF-BP as well as various mutant FGF-BP deletion constructs were cloned and recombinantly expressed. Protein-protein interaction studies revealed new ligands for FGF-BP within the FGF family (FGF4, FGF8). Moreover, the DNA-associated high-mobility group A (HMGA) protein was identified as a new binding partner for FGF-BP. *In vitro* stabilization assays revealed the affinity of FGF-BP to nucleic acids. In the presence of genomic DNA enhanced protein stability was observed. Taken together, these data support the hypothesis of a recently discovered and so far unexplored intracellular mechanism of FGF-BP action.

In conclusion, this thesis elucidates the role of FGF-BP in a complex network of cytoprotective and proliferative effects. It could be demonstrated that the selective depletion of FGF-BP increases the cellular rate of apoptosis and causes cell cycle prolongation, leading to reduced tumor growth. Moreover, the findings allow to better evaluate the efficacy of an antitumoral therapy based on the knockdown of FGF-BP expression. Thus, FGF-BP represents a promising therapeutic target in the treatment of cancer.

8 Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
AOX	Alkoholoxidase
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
as	<i>antisense</i> , Gegenstrang
Bv	Baculovirus
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CDKI	Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen
CFU/ CFC	<i>colony forming unit/ ~cell</i>
CMV	Cytomegalie-Virus
COS	<u>C</u> V-1 <i>origin-defective</i> <u>S</u> imian-Virus (SV40)
CRC	<i>Colorectal carcinoma</i> , kolorektales Karzinom
Da	Dalton
dd	<i>double-distilled</i> , doppelt entionisiert (syn. MilliQ-Wasser)
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxynukleotidtriphosphat, allg. für die DNA-Bausteine dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Dox	Doxycyclin
ds	<i>double-stranded</i> , doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , hier syn. zu Durchflußzytometrie
FCS	fetales Kälberserum
FGF-BP	FGF-Bindeprotein
FGFR	FGF-Rezeptor (Rezeptor-Tyrosinkinase)
GlcNAc-T	N-Acetylglucosaminy-Transferase
GnT	N-Acetylglucosaminy-Transferase
GSH, GSSG	<u>G</u> lutathion (reduzierte <u>S</u> H-Gruppe), Glutathion-Disulfid
GST	Glutathion-S-Transferase
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde(n)
HBp17	ursprüngliche Bezeichnung für FGF-BP (<i>Heparin-Bindeprotein</i> 17kDa)
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HMGA	<i>High mobility group A-Protein</i>
HPV	humanes Papillomavirus
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (zelluläre Überlebensrate von 50%)
ICR	<i>intragene control regions</i> , Funktionseinheit eines Promotors
IHC	Immunhistochemie
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LMW	<i>low-molecular weight</i> , niedermolekular
LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i> , DNA-analoge Verbindung mit modifizierten Ribose-Einheiten
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i> , Klonierungsstellen

mdr	<i>multiple drug resistance</i>
min	Minuten
miRNA	<i>microRNA</i>
Mut ^s / Mut ⁺	<i>Methanol utilisation (slow/fast)</i> , Methanolverwertung bei <i>P. pastoris</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> , molekulare Ausschlußgrenze
N/P-Ratio	Verhältnis Stickstoffatome des kationischen PEI-Polymers zu Phosphataten der DNA
NDST-1	<i>N</i> -Deacetylase/ <i>N</i> -Sulfotransferase-1
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssequenz
nt.	Nukleotid(e)
ODN	Oligodinukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
P-gp	P-Glykoprotein
pI	isoelektrischer Punkt
PI	Propidiumiodid
Pol	Polymerase
PSE	proximale Sequenz-Elemente
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RKI	Robert-Koch Institut
RLU	<i>relative light unit</i> , relative Lichteinheit
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktiver Sauerstoff
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
RTK/ RTKI	Rezeptor-Tyrosinkinase / Rezeptor-Tyrosinkinase Inhibitor
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
Rz.	Ribozym
SD	Standardabweichung
se	<i>sense</i>
SEM	Standardfehler
shRNA/ siRNA	<i>small-hairpin RNA/ small-interfering RNA</i>
SNPs	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
SOD	Superoxiddismutase
ss	<i>single-stranded</i> , einzelsträngig
STIKO	Ständige Impfkommission
Tet	Tetracyclin
TetO	Tetracyclin Operator Sequenz
Tet-on	positive Regulation der Genexpression durch Zugabe von Tetracyclinen
TetR	Tet-Repressor
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
ü.N.	über Nacht
UR	<i>unrelated</i> , unspezifisch
UT	<i>untreated</i> , ohne Behandlung
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WST-1	<i>water-soluble Tetrazolium-salt 1</i> , Lebendfarbstoff von Roche
wt	Wildtyp

9 Literaturverzeichnis

1. <https://www-ec.destatis.de>. Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2008: Statistisches Bundesamt Deutschland.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Sobin, L.W., Ch., *TNM Classification of Malignant Tumors*. 6th ed., ed. N.J.J.W. Sons. 2002, New York.
4. Hollstein, M., et al., *Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(17): p. 3551-5.
5. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
6. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
7. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3291-310.
8. Olivier, M., M. Hollstein, and P. Hainaut, *TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(1): p. a001008.
9. Riley, T., et al., *Transcriptional control of human p53-regulated genes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(5): p. 402-12.
10. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
11. Sherr, C.J., *Principles of tumor suppression*. Cell, 2004. **116**(2): p. 235-46.
12. Mehlen, P. and A. Puisieux, *Metastasis: a question of life or death*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 449-58.
13. Fidler, I.J. and G. Poste, *The "seed and soil" hypothesis revisited*. Lancet Oncol, 2008. **9**(8): p. 808.
14. Eccles, S.A. and D.R. Welch, *Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies*. Lancet, 2007. **369**(9574): p. 1742-57.
15. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 448-56.
16. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 401-10.
17. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
18. Presta, M., et al., *Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 159-78.
19. Stavri, G.T., et al., *Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia*. Circulation, 1995. **92**(1): p. 11-4.
20. Seghezzi, G., et al., *Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis*. J Cell Biol, 1998. **141**(7): p. 1659-73.
21. Goto, F., et al., *Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels*. Lab Invest, 1993. **69**(5): p. 508-17.
22. Asahara, T., et al., *Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo*. Circulation, 1995. **92**(9 Suppl): p. II365-71.
23. Pouyssegur, J., F. Dayan, and N.M. Mazure, *Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 437-43.
24. Galban, S. and M. Gorospe, *Factors interacting with HIF-1alpha mRNA: novel therapeutic targets*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(33): p. 3853-60.

25. Richard, D.E., et al., *p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32631-7.
26. Eliceiri, B.P., et al., *Integrin alphavbeta3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis*. J Cell Biol, 1998. **140**(5): p. 1255-63.
27. Warren, R.S., et al., *Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis*. J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1789-97.
28. Yuan, F., et al., *Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14765-70.
29. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
30. Johnstone, K.D., et al., *Synthesis and biological evaluation of polysulfated oligosaccharide glycosides as inhibitors of angiogenesis and tumor growth*. J Med Chem, 2010. **53**(4): p. 1686-99.
31. Kudchadkar, R., R. Gonzalez, and K.D. Lewis, *PI-88: a novel inhibitor of angiogenesis*. Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(11): p. 1769-76.
32. Liu, C.J., et al., *Heparanase inhibitor PI-88 as adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma after curative resection: a randomized phase II trial for safety and optimal dosage*. J Hepatol, 2009. **50**(5): p. 958-68.
33. <http://globocan.iarc.fr/>. WHO-GLOBOCAN 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008.
34. <http://www.rki.de/>. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010.
35. <http://www.cancer.org/Cancer/ColonandRectumCancer/DetailedGuide/colorectal-cancer-treating-by-stage-colon>. Treatment by stage of colon cancer.
36. Punt, C.J. and J. Tol, *More is less -- combining targeted therapies in metastatic colorectal cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(12): p. 731-3.
37. Tol, J., et al., *Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **360**(6): p. 563-72.
38. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell, 1996. **87**(2): p. 159-70.
39. Cunningham, D., et al., *Colorectal cancer*. Lancet, 2010. **375**(9719): p. 1030-47.
40. Korinek, V., et al., *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1784-7.
41. Morin, P.J., et al., *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1787-90.
42. van de Wetering, M., et al., *The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells*. Cell, 2002. **111**(2): p. 241-50.
43. Mosimann, C., G. Hausmann, and K. Basler, *Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(4): p. 276-86.
44. Zhang, L., et al., *Chemoprevention of colorectal cancer by targeting APC-deficient cells for apoptosis*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 1058-61.
45. Jass, J.R., *Colorectal cancer: a multipathway disease*. Crit Rev Oncog, 2006. **12**(3-4): p. 273-87.
46. Parsons, D.W., et al., *Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway*. Nature, 2005. **436**(7052): p. 792.
47. Ray, R., et al., *Up-regulation of fibroblast growth factor-binding protein, by beta-catenin during colon carcinogenesis*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8085-9.
48. Tassi, E. and A. Wellstein, *Tumor angiogenesis: initiation and targeting - therapeutic targeting of an FGF-binding protein, an angiogenic switch molecule, and indicator of early stages of gastrointestinal adenocarcinomas*. Cancer Res Treat, 2006. **38**(4): p. 189-97.
49. Munoz, N., et al., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 518-27.
50. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
51. Yee, C., et al., *Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines*. Am J Pathol, 1985. **119**(3): p. 361-6.

52. Pater, M.M. and A. Pater, *Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix*. Virology, 1985. **145**(2): p. 313-8.
53. Hepburn, H.M. and A.M. Kaufmann, *[Nobel price for vaccination against cervical cancer: current data and guidelines]*. Internist (Berl), 2009. **50**(5): p. 617-26.
54. Michels, K.B. and H. zur Hausen, *HPV vaccine for all*. Lancet, 2009. **374**(9686): p. 268-70.
55. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account*. Virology, 2009. **384**(2): p. 260-5.
56. <http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/H/HPV/Papillomaviren.html>. Informationen des RKI (Robert-Koch-Instituts) zu HPV.
57. Movva, S., et al., *Novel chemotherapy approaches for cervical cancer*. Cancer, 2009. **115**(14): p. 3166-80.
58. Radu, A., et al., *Expression of follicle-stimulating hormone receptor in tumor blood vessels*. N Engl J Med, 2010. **363**(17): p. 1621-30.
59. Vogel, C., et al., *Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line*. Mol Syst Biol, 2010. **6**: p. 400.
60. de Sousa Abreu, R., et al., *Global signatures of protein and mRNA expression levels*. Mol Biosyst, 2009. **5**(12): p. 1512-26.
61. Velculescu, V.E., et al., *Serial analysis of gene expression*. Science, 1995. **270**(5235): p. 484-7.
62. Anisimov, S.V., *Serial Analysis of Gene Expression (SAGE): 13 years of application in research*. Curr Pharm Biotechnol, 2008. **9**(5): p. 338-50.
63. Petitjean, A., et al., *Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database*. Hum Mutat, 2007. **28**(6): p. 622-9.
64. Vazquez, A., et al., *The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(12): p. 979-87.
65. Sorsa, M. and D. Anderson, *Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents*. Mutat Res, 1996. **355**(1-2): p. 253-61.
66. McClendon, A.K. and N. Osheroff, *DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer*. Mutat Res, 2007. **623**(1-2): p. 83-97.
67. O'Neill, V.J. and C.J. Twelves, *Oral cancer treatment: developments in chemotherapy and beyond*. Br J Cancer, 2002. **87**(9): p. 933-7.
68. Bergers, G. and D. Hanahan, *Modes of resistance to anti-angiogenic therapy*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(8): p. 592-603.
69. Gottesman, M.M., *Mechanisms of cancer drug resistance*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 615-27.
70. Sharom, F.J., *ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance*. Pharmacogenomics, 2008. **9**(1): p. 105-27.
71. Peng, Z., et al., *Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with small interference RNA (siRNA) in leukemia cells*. Cancer Gene Ther, 2004. **11**(11): p. 707-12.
72. Wu, H., W.N. Hait, and J.M. Yang, *Small interfering RNA-induced suppression of MDRI (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(7): p. 1515-9.
73. Bissell, M.J. and D. Radisky, *Putting tumours in context*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 46-54.
74. Yamada, K.M. and E. Cukierman, *Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D*. Cell, 2007. **130**(4): p. 601-10.
75. Nelson, C.M. and M.J. Bissell, *Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 287-309.
76. Weigelt, B., et al., *HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **122**(1): p. 35-43.
77. Eccles, S., *Basic Principles for the Study of Metastasis Using Animal Models* Metastasis Research Protocols, ed. S.B.U. Schumacher. 2001: Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
78. Eccles, S.A., C. Box, and W. Court, *Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery*. Biotechnol Annu Rev, 2005. **11**: p. 391-421.

79. Teicher, B.A., *Tumor Models in Cancer Research, 2nd Ed.* 2011: Humana Press (Springer Science+Business Media).
80. Esko, J.D., K.S. Rostand, and J.L. Weinke, *Tumor formation dependent on proteoglycan biosynthesis.* Science, 1988. **241**(4869): p. 1092-6.
81. Rusnati, M. and M. Presta, *Interaction of angiogenic basic fibroblast growth factor with endothelial cell heparan sulfate proteoglycans. Biological implications in neovascularization.* Int J Clin Lab Res, 1996. **26**(1): p. 15-23.
82. Kraemer, P., *Mucopolysaccharides: cell biology and malignancy.* in: Surfaces of normal and malignant cells, ed. R.O. Hynes. 1979: Wiley, N.Y.: p. 149-98.
83. Hacker, U., K. Nybakken, and N. Perrimon, *Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(7): p. 530-41.
84. S. Ayad, R.P.B.-H., M.J. Humphries, K.E. Kadler, C.A. Shuttleworth, *The Extracellular Matrix (Facts Book).* ed. A. Press. 1998: Harcourt Brace & Company.
85. Hynes, R.O., *The extracellular matrix: not just pretty fibrils.* Science, 2009. **326**(5957): p. 1216-9.
86. Kubow, K.E., et al., *Crosslinking of cell-derived 3D scaffolds up-regulates the stretching and unfolding of new extracellular matrix assembled by reseeded cells.* Integr Biol (Camb), 2009. **1**(11-12): p. 635-48.
87. Bissell, M.J., H.G. Hall, and G. Parry, *How does the extracellular matrix direct gene expression?* J Theor Biol, 1982. **99**(1): p. 31-68.
88. Bissell, M.J. and J. Aggeler, *Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression?* Prog Clin Biol Res, 1987. **249**: p. 251-62.
89. Sasisekharan, R., et al., *Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 521-8.
90. Gabius, H.J., *Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code.* Naturwissenschaften, 2000. **87**(3): p. 108-21.
91. Gabius, H.J., et al., *The sugar code: functional lectinomics.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 165-77.
92. Bertozzi, C.R. and L.L. Kiessling, *Chemical glycobiology.* Science, 2001. **291**(5512): p. 2357-64.
93. Feizi, T. and B. Mulloy, *Carbohydrates and glycoconjugates. Glycomics: the new era of carbohydrate biology.* Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(5): p. 602-4.
94. Khalkhali, Z. and R.D. Marshall, *UDP-N-acetyl-D-glucosamine-asparagine sequon N-acetyl-beta-D-glucosaminyl-transferase-activity in human serum.* Carbohydr Res, 1976. **49**: p. 455-73.
95. Reuter, G. and H.J. Gabius, *Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool?* Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(3): p. 368-422.
96. Wormald, M.R. and R.A. Dwek, *Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability.* Structure, 1999. **7**(7): p. R155-60.
97. Sugahara, K. and H. Kitagawa, *Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans.* Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(5): p. 518-27.
98. Naoyuki Taniguchi, K.H., Minoru Fukuda, *Handbook of glycosyltransferases and related genes*, ed. S. Verlag. 2002, Tokyo.
99. Zhao, Y.Y., et al., *Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer.* Cancer Sci, 2008. **99**(7): p. 1304-10.
100. Chen, L., et al., *The her-2/neu oncogene stimulates the transcription of N-acetylglucosaminyltransferase V and expression of its cell surface oligosaccharide products.* Oncogene, 1998. **17**(16): p. 2087-93.
101. Dennis, J.W., et al., *Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis.* Science, 1987. **236**(4801): p. 582-5.
102. Yoshimura, M., et al., *Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8754-8.
103. Itoh, N. and D.M. Ornitz, *Evolution of the Fgf and Fgfr gene families.* Trends Genet, 2004. **20**(11): p. 563-9.
104. Goldfarb, M., *Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function.* Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 215-20.

105. Itoh, N. and D.M. Ornitz, *Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family*. Dev Dyn, 2008. **237**(1): p. 18-27.
106. Gospodarowicz, D., *Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth*. Nature, 1974. **249**(453): p. 123-7.
107. Rubin, J.S., et al., *Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(3): p. 802-6.
108. Goetz, R., et al., *Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(9): p. 3417-28.
109. Urakawa, I., et al., *Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23*. Nature, 2006. **444**(7120): p. 770-4.
110. Beenken, A. and M. Mohammadi, *The FGF family: biology, pathophysiology and therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(3): p. 235-53.
111. Gospodarowicz, D. and J. Cheng, *Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation*. J Cell Physiol, 1986. **128**(3): p. 475-84.
112. Ornitz, D.M., *FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development*. Bioessays, 2000. **22**(2): p. 108-12.
113. Kan, M., et al., *An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase*. Science, 1993. **259**(5103): p. 1918-21.
114. Eswarakumar, V.P., I. Lax, and J. Schlessinger, *Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 139-49.
115. Wiedemann, M. and B. Trueb, *Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors*. Genomics, 2000. **69**(2): p. 275-9.
116. Pardo, O.E., et al., *Fibroblast growth factor-2 induces translational regulation of Bcl-XL and Bcl-2 via a MEK-dependent pathway: correlation with resistance to etoposide-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(14): p. 12040-6.
117. Pardo, O.E., et al., *FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKCepsilon, B-Raf and S6K2*. Embo J, 2006. **25**(13): p. 3078-88.
118. Turner, N. and R. Grose, *Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(2): p. 116-29.
119. Ito, T., et al., *Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity*. Science, 2010. **327**(5971): p. 1345-50.
120. Mignatti, P., T. Morimoto, and D.B. Rifkin, *Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex*. J Cell Physiol, 1992. **151**(1): p. 81-93.
121. Revest, J.M., L. DeMoerlooze, and C. Dickson, *Fibroblast growth factor 9 secretion is mediated by a non-cleaved amino-terminal signal sequence*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 8083-90.
122. Nickel, W., *Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells*. Traffic, 2005. **6**(8): p. 607-14.
123. Bryant, D.M. and J.L. Stow, *Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor*. Traffic, 2005. **6**(10): p. 947-54.
124. Whitelock, J.M., et al., *The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10079-86.
125. Vlodavsky, I., et al., *The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2006. **35**(1-2): p. 116-27.
126. Vlodavsky, I., et al., *Heparanase: structure, biological functions, and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(20): p. 2057-73.
127. Rogelj, S., et al., *Basic fibroblast growth factor fused to a signal peptide transforms cells*. Nature, 1988. **331**(6152): p. 173-5.
128. Wu, D.Q., et al., *Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors*. J Biol Chem, 1991. **266**(25): p. 16778-85.
129. Aigner, A., et al., *An FGF-binding protein (FGF-BP) exerts its biological function by parallel paracrine stimulation of tumor cell and endothelial cell proliferation through FGF-2 release*. Int J Cancer, 2001. **92**(4): p. 510-7.

130. Tassi, E., et al., *Expression of a fibroblast growth factor-binding protein during the development of adenocarcinoma of the pancreas and colon*. *Cancer Res*, 2006. **66**(2): p. 1191-8.
131. Sauter, E.R., et al., *Fibroblast growth factor-binding protein expression changes with disease progression in clinical and experimental human squamous epithelium*. *Int J Cancer*, 2001. **92**(3): p. 374-81.
132. Wang, X.C., et al., *Purification of heparin-binding protein HBp17 and identification of HBp17 heparin binding site*. *Biochem Mol Biol Int*, 1998. **46**(1): p. 81-7.
133. Lametsch, R., et al., *Structural characterization of the fibroblast growth factor-binding protein purified from bovine prepartum mammary gland secretion*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(26): p. 19469-74.
134. Ogawa, K., et al., *A novel serum protein that is selectively produced by cytotoxic lymphocytes*. *J Immunol*, 2001. **166**(10): p. 6404-12.
135. Schmidt, J., *A Novel Binding Protein for Fibroblast Growth Factors (FGF-BP2): Cloning, Expression Profile, Tumorigenic Activity and Regulation of Gene Expression by Fetal Bovine Serum and Retinoic Acid*. 2003, Philipps-Universität Marburg: Dissertation Fachbereich Pharmakologie und Toxikologie.
136. Zhang, W., et al., *Effect of FGF-binding protein 3 on vascular permeability*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(42): p. 28329-37.
137. Aigner, A., et al., *Tissue distribution and retinoid-mediated downregulation of an FGF-binding protein (FGF-BP) in the rat*. *Growth Factors*, 2000. **18**(1): p. 51-62.
138. Gibby, K.A., et al., *A distinct role for secreted fibroblast growth factor-binding proteins in development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(21): p. 8585-90.
139. Lee, H.O., et al., *Fgfbp1 is essential for the cellular survival during zebrafish embryogenesis*. *Mol Cells*, 2010. **29**(5): p. 501-7.
140. Abuharbeid, S., F. Czubyko, and A. Aigner, *The fibroblast growth factor-binding protein FGF-BP*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006. **38**(9): p. 1463-8.
141. Aigner, A., et al., *Immunolocalization of an FGF-binding protein reveals a widespread expression pattern during different stages of mouse embryo development*. *Histochem Cell Biol*, 2002. **117**(1): p. 1-11.
142. Kurtz, A., et al., *Expression of a binding protein for FGF is associated with epithelial development and skin carcinogenesis*. *Oncogene*, 1997. **14**(22): p. 2671-81.
143. Kurtz, A., et al., *Differential regulation of a fibroblast growth factor-binding protein during skin carcinogenesis and wound healing*. *Neoplasia*, 2004. **6**(5): p. 595-602.
144. Mongiat, M., et al., *Fibroblast growth factor-binding protein is a novel partner for perlecan protein core*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(13): p. 10263-71.
145. Begum, S., et al., *Immunohistochemical expression of heparin-binding protein 17/fibroblast growth factor-binding protein-1 (HBp17/FGFBP-1) as an angiogenic factor in head and neck tumorigenesis*. *Oncol Rep*, 2007. **17**(3): p. 591-6.
146. Li, W., et al., *Expression of fibroblast growth factor binding protein in head and neck cancer*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009. **135**(9): p. 896-901.
147. Czubyko, F., et al., *A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer*. *Nat Med*, 1997. **3**(10): p. 1137-40.
148. Aigner, A., et al., *Ribozyme-targeting of a secreted FGF-binding protein (FGF-BP) inhibits proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo*. *Oncogene*, 2002. **21**(37): p. 5733-42.
149. Kagan, B.L., et al., *Complex regulation of the fibroblast growth factor-binding protein in MDA-MB-468 breast cancer cells by CCAAT/enhancer-binding protein beta*. *Cancer Res*, 2003. **63**(7): p. 1696-705.
150. Zheng, H.Q., et al., *Kruppel-like factor 5 promotes breast cell proliferation partially through upregulating the transcription of fibroblast growth factor binding protein 1*. *Oncogene*, 2009. **28**(42): p. 3702-13.
151. Tassi, E. and A. Wellstein, *The angiogenic switch molecule, secreted FGF-binding protein, an indicator of early stages of pancreatic and colorectal adenocarcinoma*. *Semin Oncol*, 2006. **33**(6 Suppl 11): p. S50-6.
152. Czubyko, F., et al., *Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(45): p. 28243-8.
153. Okamoto, T., *Expression of Fibroblast Growth Factor Binding Protein HBp17 in Normal and Tumor cells*. *In vitro cell Dev. biol. Anim*, 1996. **32**: p. 69-71.

154. Moser, A.R., H.C. Pitot, and W.F. Dove, *A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse*. Science, 1990. **247**(4940): p. 322-4.
155. Harris, V.K., et al., *Serum induction of the fibroblast growth factor-binding protein (FGF-BP) is mediated through ERK and p38 MAP kinase activation and C/EBP-regulated transcription*. Oncogene, 2001. **20**(14): p. 1730-8.
156. Williams, A.H., et al., *MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice*. Science, 2009. **326**(5959): p. 1549-54.
157. Liu, X.H., et al., *Up-regulation of a fibroblast growth factor binding protein in children with renal diseases*. Kidney Int, 2001. **59**(5): p. 1717-28.
158. Ray, P.E., et al., *Role of fibroblast growth factor-binding protein in the pathogenesis of HIV-associated hemolytic uremic syndrome*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **290**(1): p. R105-13.
159. Chen, C., et al., *KLF5 promotes cell proliferation and tumorigenesis through gene regulation and the TSU-Pr1 human bladder cancer cell line*. Int J Cancer, 2006. **118**(6): p. 1346-55.
160. Zhao, Y., et al., *Kruppel-like factor 5 modulates p53-independent apoptosis through Pim1 survival kinase in cancer cells*. Oncogene, 2008. **27**(1): p. 1-8.
161. Zhu, N., et al., *KLF5 Interacts with p53 in regulating survivin expression in acute lymphoblastic leukemia*. J Biol Chem, 2006. **281**(21): p. 14711-8.
162. Harris, V.K., et al., *Phorbol ester-induced transcription of a fibroblast growth factor-binding protein is modulated by a complex interplay of positive and negative regulatory promoter elements*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 19130-9.
163. Beer, H.D., et al., *The fibroblast growth factor binding protein is a novel interaction partner of FGF-7, FGF-10 and FGF-22 and regulates FGF activity: implications for epithelial repair*. Oncogene, 2005. **24**(34): p. 5269-77.
164. Harris, V.K., et al., *Induction of the angiogenic modulator fibroblast growth factor-binding protein by epidermal growth factor is mediated through both MEK/ERK and p38 signal transduction pathways*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 10802-11.
165. Stoppler, H., et al., *The human papillomavirus (HPV) 16 E6 oncoprotein leads to an increase in gene expression of the angiogenic switch molecule FGF-BP in non-immortalized human keratinocytes*. Oncogene, 2001. **20**(50): p. 7430-6.
166. Bachis, A., et al., *Chronic antidepressant treatments increase basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor-binding protein in neurons*. Neuropharmacology, 2008. **55**(7): p. 1114-20.
167. Rosini, P., et al., *Androgen receptor expression induces FGF2, FGF-binding protein production, and FGF2 release in prostate carcinoma cells: role of FGF2 in growth, survival, and androgen receptor down-modulation*. Prostate, 2002. **53**(4): p. 310-21.
168. Altucci, L., et al., *RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(10): p. 793-810.
169. Liaudet-Coopman, E.D., G.J. Berchem, and A. Wellstein, *In vivo inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by retinoic acid in squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(2): p. 179-84.
170. Boyle, B.J., et al., *Differential regulation of a fibroblast growth factor-binding protein by receptor-selective analogs of retinoic acid*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(11): p. 1677-84.
171. Liaudet-Coopman, E.D. and A. Wellstein, *Regulation of gene expression of a binding protein for fibroblast growth factors by retinoic acid*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21303-8.
172. Zhao, D., et al., *The Fbw7 tumor suppressor targets KLF5 for ubiquitin-mediated degradation and suppresses breast cell proliferation*. Cancer Res, 2010. **70**(11): p. 4728-38.
173. Sherif, Z.A., et al., *Downmodulation of bFGF-binding protein expression following restoration of p53 function*. Cancer Gene Ther, 2001. **8**(10): p. 771-82.
174. Briones, V.R., et al., *Mechanism of fibroblast growth factor-binding protein 1 repression by TGF-beta*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(2): p. 595-601.
175. Xie, B., et al., *Identification of the fibroblast growth factor (FGF)-interacting domain in a secreted FGF-binding protein by phage display*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 1137-44.
176. Tassi, E., et al., *Enhancement of fibroblast growth factor (FGF) activity by an FGF-binding protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40247-53.
177. Tassi, E., et al., *Effects on neurite outgrowth and cell survival of a secreted fibroblast growth factor binding protein upregulated during spinal cord injury*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(2): p. R775-83.

178. Ringvall, M., et al., *Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 25926-30.
179. Kjellen, L., *Glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferases in heparan sulphate biosynthesis and biology*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(2): p. 340-2.
180. Pallerla, S.R., et al., *Heparan sulfate Ndst1 gene function variably regulates multiple signaling pathways during mouse development*. Dev Dyn, 2007. **236**(2): p. 556-63.
181. Newman, D.R., et al., *Fibroblast growth factor-binding protein and N-deacetylase/N-sulfotransferase-1 expression in type II cells is modulated by heparin and extracellular matrix*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(5): p. L1314-20.
182. Abuharbeid, S., *The Fibroblast Growth Factor-binding Protein (FGF-BP) and the Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2): functional studies on two gene products relevant in Ovarian cancer*. 2005, Philipps-Universität Marburg: Dissertation Fachbereich Pharmakologie und Toxikologie.
183. McDonnell, K., et al., *Vascular leakage in chick embryos after expression of a secreted binding protein for fibroblast growth factors*. Lab Invest, 2005. **85**(6): p. 747-55.
184. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
185. Chen, J.H., X.C. Wang, and J.D. Sato, *Bifunctional effects of heparin-binding protein HBp17 on DNA synthesis in cells*. Cell Biol Int, 2001. **25**(6): p. 567-70.
186. Li, W.M. and W.B. Chen, *Effect of FGF-BP on angiogenesis in squamous cell carcinoma*. Chin Med J (Engl), 2004. **117**(4): p. 621-3.
187. Liaudet-Coopman, E.D., et al., *A tetracycline-responsive promoter system reveals the role of a secreted binding protein for FGFs during the early phase of tumor growth*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **229**(3): p. 930-7.
188. Grosschedl, R., K. Giese, and J. Pagel, *HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures*. Trends Genet, 1994. **10**(3): p. 94-100.
189. Reeves, R., *Nuclear functions of the HMG proteins*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(1-2): p. 3-14.
190. Fedele, M., et al., *Human colorectal carcinomas express high levels of high mobility group HMGI(Y) proteins*. Cancer Res, 1996. **56**(8): p. 1896-901.
191. Fusco, A. and M. Fedele, *Roles of HMGA proteins in cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(12): p. 899-910.
192. Chiappetta, G., et al., *High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development*. Oncogene, 1996. **13**(11): p. 2439-46.
193. Liao, S.S., et al., *Overexpression of HMGA1 promotes anoikis resistance and constitutive Akt activation in pancreatic adenocarcinoma cells*. Br J Cancer, 2007. **96**(6): p. 993-1000.
194. Bandiera, A., et al., *Expression of HMGI(Y) proteins in squamous intraepithelial and invasive lesions of the uterine cervix*. Cancer Res, 1998. **58**(3): p. 426-31.
195. Bertrand, J.R., et al., *Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(4): p. 1000-4.
196. Grunweller, A., et al., *Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(12): p. 3185-93.
197. Miyagishi, M., M. Hayashi, and K. Taira, *Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2003. **13**(1): p. 1-7.
198. Low, J., et al., *High-content imaging analysis of the knockdown effects of validated siRNAs and antisense oligonucleotides*. J Biomol Screen, 2007. **12**(6): p. 775-88.
199. Brus, C., *Physicochemical and biological properties of Polyethylenimine based delivery systems for Oligonucleotides and ribozymes*, in *Dissertation Fachbereich Pharmazie*. 2004, Philipps-Universität Marburg.
200. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
201. Valencia-Sanchez, M.A., et al., *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 515-24.

202. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
203. Sakurai, K., et al., *A role for human Dicer in pre-RISC loading of siRNAs*. Nucleic Acids Res, 2010.
204. Hamilton, A.J. and D.C. Baulcombe, *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants*. Science, 1999. **286**(5441): p. 950-2.
205. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
206. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 188-200.
207. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-16.
208. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
209. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
210. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-40.
211. Pham, J.W., et al., *A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in Drosophila*. Cell, 2004. **117**(1): p. 83-94.
212. Ameres, S.L., J. Martinez, and R. Schroeder, *Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC*. Cell, 2007. **130**(1): p. 101-12.
213. Martinez, J., et al., *Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi*. Cell, 2002. **110**(5): p. 563-74.
214. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
215. Kurreck, J., *RNA interference: from basic research to therapeutic applications*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(8): p. 1378-98.
216. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami, *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. Science, 2002. **296**(5567): p. 550-3.
217. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami, *Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference*. Cancer Cell, 2002. **2**(3): p. 243-7.
218. Harborth, J., et al., *Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2003. **13**(2): p. 83-105.
219. Paddison, P.J., et al., *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*. Genes Dev, 2002. **16**(8): p. 948-58.
220. Donze, O. and D. Picard, *RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(10): p. e46.
221. Sohail, M., et al., *A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(7): p. e38.
222. Kim, D.H., et al., *Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 321-5.
223. Braasch, D.A., et al., *RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA*. Biochemistry, 2003. **42**(26): p. 7967-75.
224. Chiu, Y.L. and T.M. Rana, *siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis*. Rna, 2003. **9**(9): p. 1034-48.
225. Elbashir, S.M., et al., *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate*. Embo J, 2001. **20**(23): p. 6877-88.
226. Holen, T., et al., *Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(8): p. 1757-66.
227. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
228. Kim, D.H., et al., *Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(2): p. 222-6.

-
229. Mittal, V., *Improving the efficiency of RNA interference in mammals*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(5): p. 355-65.
230. Birmingham, A., et al., *A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity*. Nat Protoc, 2007. **2**(9): p. 2068-78.
231. Martinez, J., et al., *Analysis of mammalian gene function using small interfering RNAs*. Nucleic Acids Res Suppl, 2003(3): p. 333.
232. Reynolds, A., et al., *Rational siRNA design for RNA interference*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 326-30.
233. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
234. Geisbert, T.W., et al., *Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study*. Lancet, 2010. **375**(9729): p. 1896-905.
235. Sioud, M., *Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization*. J Mol Biol, 2005. **348**(5): p. 1079-90.
236. Sledz, C.A., et al., *Activation of the interferon system by short-interfering RNAs*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(9): p. 834-9.
237. Schulze, D., *Nanosystems for the delivery of RNAi*. Therapeutic Ribonucleic Acids in Brain Tumors, ed. G.R. V. A. Erdmann, J. Barciszewski. 2009: Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
238. Aigner, A., *Cellular delivery in vivo of siRNA-based therapeutics*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(34): p. 3603-19.
239. Höbel, S. and A. Aigner, *Polyethylenimine (PEI)/siRNA-mediated gene knockdown in vitro and in vivo*. Methods Mol Biol, 2010. **623**: p. 283-97.
240. Juliano, R., et al., *Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(12): p. 4158-71.
241. Cereghino, J.L. and J.M. Cregg, *Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev, 2000. **24**(1): p. 45-66.
242. Macauley-Patrick, S., et al., *Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system*. Yeast, 2005. **22**(4): p. 249-70.
243. Chen, X., *Analysis of the High-Mobility-Group A1 Protein as a Putative Novel Binding Partner for Fibroblast Growth Factor Binding Protein-1*. 2006, Philipps-Universität Marburg: Diplom-Arbeit Fachbereich Pharmakologie und Toxikologie.
244. Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2006: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
245. Vaughn, J.L., et al., *The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae)*. In Vitro, 1977. **13**(4): p. 213-7.
246. Gluzman, Y., *SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants*. Cell, 1981. **23**(1): p. 175-82.
247. Sykes, J.A., et al., *Some properties of a new epithelial cell line of human origin*. J Natl Cancer Inst, 1970. **45**(1): p. 107-22.
248. Tom, B.H., et al., *Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line*. In Vitro, 1976. **12**(3): p. 180-91.
249. Leibovitz, A., et al., *New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(2): p. 691-7.
250. Kaighn, M.E., et al., *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest Urol, 1979. **17**(1): p. 16-23.
251. Urban-Klein, B., et al., *RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo*. Gene Ther, 2005. **12**(5): p. 461-6.
252. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
253. Jesnowski, R., J. Naehring, and K. Wolf, *A rapid and reliable method for PCR-based amplification of chromosomal and mitochondrial DNA from intact yeast cells*. Curr Genet, 1995. **27**(4): p. 318-9.
254. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

255. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
256. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
257. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama, *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. Gene, 1990. **96**(1): p. 23-8.
258. Amann, E., J. Brosius, and M. Ptashne, *Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in Escherichia coli*. Gene, 1983. **25**(2-3): p. 167-78.
259. Gietz, R.D., and Schiestl, R. H., *Transforming Yeast with DNA*. in Methods in Molecular Biology, (Evans, I. H., ed.) Totowa, NJ, 1996: Humana Press
260. Scorer, C.A., et al., *Rapid selection using G418 of high copy number transformants of Pichia pastoris for high-level foreign gene expression*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(2): p. 181-4.
261. Tao, H., et al., *Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS*. Biotechniques, 2010. **48**(1): p. 61-4.
262. Frangioni, J.V. and B.G. Neel, *Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins*. Anal Biochem, 1993. **210**(1): p. 179-87.
263. Arnold, F.H., *Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(2): p. 151-6.
264. Pellegrini, L., *Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(5): p. 629-34.
265. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
266. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
267. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
268. Hashimoto, F., et al., *An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel*. Anal Biochem, 1983. **129**(1): p. 192-9.
269. Schagger, H. and G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem, 1987. **166**(2): p. 368-79.
270. Blum, H., H. Beier, and H. Gross, *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. Electrophoresis, 1987. **8**(2): p. 93-99.
271. Garcia-Calvo, M., et al., *Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32608-13.
272. Garcia-Calvo, M., et al., *Purification and catalytic properties of human caspase family members*. Cell Death Differ, 1999. **6**(4): p. 362-9.
273. Haseloff, J. and W.L. Gerlach, *Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities*. 1988. Biotechnology, 1992. **24**: p. 264-9.
274. Boshart, M., et al., *A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus*. Cell, 1985. **41**(2): p. 521-30.
275. Czubyko, F., A.T. Riegel, and A. Wellstein, *Ribozyme-targeting elucidates a direct role of pleiotrophin in tumor growth*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 21358-63.
276. Campbell, F.E., Jr. and D.R. Setzer, *Transcription termination by RNA polymerase III: uncoupling of polymerase release from termination signal recognition*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(5): p. 2260-72.
277. Park, J.S. and G.R. Kunkel, *Both RNA polymerase III and RNA polymerase II accurately initiate transcription from a human U6 promoter in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **214**(3): p. 934-40.
278. Editorial, *Whither RNAi?* Nat Cell Biol, 2003. **5**(6): p. 489-90.
279. Marshall, N.J., C.J. Goodwin, and S.J. Holt, *A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function*. Growth Regul, 1995. **5**(2): p. 69-84.
280. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*. Biotechnol Annu Rev, 2005. **11**: p. 127-52.
281. Goutelle, S., et al., *The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling*. Fundam Clin Pharmacol, 2008. **22**(6): p. 633-48.

282. Hagenbusch, J., *Rekombinante Expression und Untersuchungen zur Funktion eines Fibroblasten-Wachstumsfaktor-bindenden Proteins (FGF-BP)*. 2010, Philipps-Universität Marburg: Dissertation Fachbereich Pharmakologie und Toxikologie.
283. Schoensiegel, F., et al., *MIA (melanoma inhibitory activity) promoter mediated tissue-specific suicide gene therapy of malignant melanoma*. *Cancer Gene Ther*, 2004. **11**(6): p. 408-18.
284. Davis, M.G. and E.S. Huang, *Transfer and expression of plasmids containing human cytomegalovirus immediate-early gene 1 promoter-enhancer sequences in eukaryotic and prokaryotic cells*. 1988. **10**(1): p. 6-12.
285. Hurtado Pico, A., et al., *Viral and nonviral factors causing nonspecific replication of tumor- and tissue-specific promoter-dependent oncolytic adenoviruses*. *Mol Ther*, 2005. **11**(4): p. 563-77.
286. Kuan, S.F., et al., *Characterization of quantitative mucin variants from a human colon cancer cell line*. *Cancer Res*, 1987. **47**(21): p. 5715-24.
287. Tom, B.H., et al., *Human colon adenocarcinoma cells. II. Tumorigenic and organoid expression in vivo and in vitro*. *J Natl Cancer Inst*, 1977. **58**(5): p. 1507-12.
288. Malek, A., et al., *A sensitive polymerase chain reaction-based method for detection and quantification of metastasis in human xenograft mouse models*. *Clin Exp Metastasis*, 2010. **27**(4): p. 261-71.
289. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
290. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
291. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. *Cell Res*, 2002. **12**(1): p. 9-18.
292. Dhanasekaran, D.M.J.G.L., *MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting MAPKs*. *Oncogene*, 2007. **26**: p. 3097-99.
293. Fang, J.Y. and B.C. Richardson, *The MAPK signalling pathways and colorectal cancer*. *Lancet Oncol*, 2005. **6**(5): p. 322-7.
294. Clare, J.J., et al., *Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using Pichia pastoris strains containing multiple gene copies*. *Gene*, 1991. **105**(2): p. 205-12.
295. Vedvick, T., et al., *High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast Pichia pastoris*. *J Ind Microbiol*, 1991. **7**(3): p. 197-201.
296. Hopkins, A.L. and C.R. Groom, *The druggable genome*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(9): p. 727-30.
297. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
298. Chatterjee-Kishore, M., *From genome to phenome--RNAi library screening and hit characterization using signaling pathway analysis*. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2006. **9**(2): p. 231-9.
299. Chatterjee-Kishore, M. and C.P. Miller, *Exploring the sounds of silence: RNAi-mediated gene silencing for target identification and validation*. *Drug Discov Today*, 2005. **10**(22): p. 1559-65.
300. Grunweller, A. and R.K. Hartmann, *RNA interference as a gene-specific approach for molecular medicine*. *Curr Med Chem*, 2005. **12**(26): p. 3143-61.
301. zu finden unter: <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>.
302. Kim, D.H. and J.J. Rossi, *Strategies for silencing human disease using RNA interference*. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(3): p. 173-184.
303. Pai, S.I., et al., *Prospects of RNA interference therapy for cancer*. *Gene Ther*, 2006. **13**(6): p. 464-77.
304. Grzelinski, M., et al., *RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs in vivo exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts*. *Hum Gene Ther*, 2006. **17**(7): p. 751-66.
305. Hobel, S. and A. Aigner, *Polyethylenimine (PEI)/siRNA-mediated gene knockdown in vitro and in vivo*. *Methods Mol Biol*. **623**: p. 283-97.
306. Sonawane, N.D., F.C. Szoka, Jr., and A.S. Verkman, *Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(45): p. 44826-31.
307. Höbel, S., et al., *Polyethylenimine/small interfering RNA-mediated knockdown of vascular endothelial growth factor in vivo exerts anti-tumor effects synergistically with Bevacizumab*. *J Gene Med*, 2010. **12**(3): p. 287-300.
308. Smrekar, B., et al., *Tissue-dependent factors affect gene delivery to tumors in vivo*. *Gene Ther*, 2003. **10**(13): p. 1079-88.

-
309. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-22.
310. Ng, E.W., et al., *Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(2): p. 123-32.
311. Harris, V.K., et al., *Mitogen-induced expression of the fibroblast growth factor-binding protein is transcriptionally repressed through a non-canonical E-box element*. J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39801.
312. Herschman, H.R., *Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 281-319.
313. Boonstra, J., *Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle*. J Cell Biochem, 2003. **90**(2): p. 244-52.
314. Iyer, V.R., et al., *The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum*. Science, 1999. **283**(5398): p. 83-7.
315. Iyer, V.R. and e. al., <http://genome-www.stanford.edu/serum/>: web supplement to Science. 1999 **283** (5398): 83-7.
316. Wellstein, A., et al., *Autocrine growth stimulation by secreted Kaposi fibroblast growth factor but not by endogenous basic fibroblast growth factor*. Cell Growth Differ, 1990. **1**(2): p. 63-71.
317. Hamburger, A.W., K.A. Lurie, and M.E. Condon, *Stimulation of anchorage-independent growth of human tumor cells by interleukin 1*. Cancer Res, 1987. **47**(21): p. 5612-5.
318. Hamburger, A.W. and C.P. White, *Autocrine growth factors for human tumor clonogenic cells*. Int J Cell Cloning, 1985. **3**(6): p. 399-406.
319. Gossen, M., et al., *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-9.
320. Gu, J., et al., *A novel single tetracycline-regulative adenoviral vector for tumor-specific Bax gene expression and cell killing in vitro and in vivo*. Oncogene, 2002. **21**(31): p. 4757-64.
321. Carlotti, F., et al., *Development of an inducible suicide gene system based on human caspase 8*. Cancer Gene Ther, 2005. **12**(7): p. 627-39.
322. Püttmann-Cyrus, S., *Induzierte Expression von Toxingenen in Tumorzellen*. 2002, Dissertation Fachbereich Biologie; Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
323. Baron, U. and H. Bujard, *Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances*. Methods Enzymol, 2000. **327**: p. 401-21.
324. Meyer-Ficca, M.L., et al., *Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies*. Anal Biochem, 2004. **334**(1): p. 9-19.
325. Mizuguchi, H. and T. Hayakawa, *Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline-controllable expression system*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1568**(1): p. 21-9.
326. Mizuguchi, H. and T. Hayakawa, *The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector*. J Gene Med, 2002. **4**(3): p. 240-7.
327. De Veylder, L., et al., *Increased leakiness of the tetracycline-inducible Triple-Op promoter in dividing cells renders it unsuitable for high inducible levels of a dominant negative CDC2aAt gene*. J Exp Bot, 2000. **51**(351): p. 1647-53.
328. Henriksen, J.R., et al., *Comparison of RNAi efficiency mediated by tetracycline-responsive H1 and U6 promoter variants in mammalian cell lines*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(9): p. e67.
329. Witzgall, R., et al., *The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4514-8.
330. Jung, H., H.A. Seong, and H. Ha, *Critical role of cysteine residue 81 of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in MIF-induced inhibition of p53 activity*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 20383-96.
331. Nguyen, T.K., et al., *Inhibition of MEK/ERK1/2 sensitizes lymphoma cells to sorafenib-induced apoptosis*. Leuk Res, 2010. **34**(3): p. 379-86.
332. Rigou, P., et al., *The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation*. Embo J, 2009. **28**(11): p. 1576-88.
333. Seong, H.A., et al., *Reciprocal negative regulation of PDK1 and ASK1 signaling by direct interaction and phosphorylation*. J Biol Chem, 2009. **285**(4): p. 2397-414.
334. Dunn, E.A. and S.D. Rader, *Secondary structure of U6 small nuclear RNA: implications for spliceosome assembly*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(4): p. 1099-104.

-
335. He, Y., et al., *Inhibition of human squamous cell carcinoma growth in vivo by epidermal growth factor receptor antisense RNA transcribed from the U6 promoter*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(14): p. 1080-7.
336. Ohkawa, J. and K. Taira, *Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(4): p. 577-85.
337. Kappel, S., et al., *Tumor inhibition by genomically integrated inducible RNAi-cassettes*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(16): p. 4527-36.
338. Kappel, S., et al., *Silencing of mammalian genes by tetracycline-inducible shRNA expression*. Nat Protoc, 2007. **2**(12): p. 3257-69.
339. Noonberg, S.B., G.K. Scott, and C.C. Benz, *Evidence of post-transcriptional regulation of U6 small nuclear RNA*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10477-81.
340. van de Wetering, M., et al., *Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector*. EMBO Rep, 2003. **4**(6): p. 609-15.
341. Simmen, K.A., et al., *Proximal sequence element factor binding and species specificity in vertebrate U6 snRNA promoters*. J Mol Biol, 1992. **223**(4): p. 873-84.
342. Mitchell, M.T., G.M. Hobson, and P.A. Benfield, *TATA box-mediated polymerase III transcription in vitro*. J Biol Chem, 1992. **267**(3): p. 1995-2005.
343. Lobo, S.M., S. Ifill, and N. Hernandez, *cis-acting elements required for RNA polymerase II and III transcription in the human U2 and U6 snRNA promoters*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(10): p. 2891-9.
344. Simmen, K.A., et al., *TFIID is required for in vitro transcription of the human U6 gene by RNA polymerase III*. Embo J, 1991. **10**(7): p. 1853-62.
345. Dahlberg, J.E. and E. Lund, *How does III x II make U6?* Science, 1991. **254**(5037): p. 1462-3.
346. Medina, M.F. and S. Joshi, *RNA-polymerase III-driven expression cassettes in human gene therapy*. Curr Opin Mol Ther, 1999. **1**(5): p. 580-94.
347. Willis, I.M., *RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity*. Eur J Biochem, 1993. **212**(1): p. 1-11.
348. Gebauer, F. and M.W. Hentze, *Molecular mechanisms of translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 827-35.
349. Abaza, I. and F. Gebauer, *Trading translation with RNA-binding proteins*. Rna, 2008. **14**(3): p. 404-9.
350. Schug, J., et al., *Promoter features related to tissue specificity as measured by Shannon entropy*. Genome Biol, 2005. **6**(4): p. R33.
351. Kunkel, G.R., *RNA polymerase III transcription of genes that lack internal control regions*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1088**(1): p. 1-9.
352. Hochheimer, A. and R. Tjian, *Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression*. Genes Dev, 2003. **17**(11): p. 1309-20.
353. Grimm, D., et al., *Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 537-41.
354. Khan, A.A., et al., *Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(6): p. 549-55.
355. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. Rna, 2004. **10**(2): p. 185-91.
356. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
357. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
358. Yi, R., et al., *Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs*. RNA, 2005. **11**(2): p. 220-6.
359. Zhou, H., X.G. Xia, and Z. Xu, *An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(6): p. e62.
360. Giering, J.C., et al., *Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic*. Mol Ther, 2008. **16**(9): p. 1630-6.
361. Yuan, J., et al., *shRNA transcribed by RNA Pol II promoter induce RNA interference in mammalian cell*. Mol Biol Rep, 2006. **33**(1): p. 43-9.
362. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. Embo J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.

-
363. Rao, M.K. and M.F. Wilkinson, *Tissue-specific and cell type-specific RNA interference in vivo*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1494-501.
364. Evan, G.I. and K.H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 342-8.
365. Aguirre-Ghiso, J.A., *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(11): p. 834-46.
366. Violette, S., et al., *Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status*. Int J Cancer, 2002. **98**(4): p. 498-504.
367. Crea, F., et al., *Epigenetic mechanisms of irinotecan sensitivity in colorectal cancer cell lines*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(7): p. 1964-73.
368. Suzuki, A., et al., *Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death*. Oncogene, 2000. **19**(10): p. 1346-53.
369. Suzuki, A., et al., *Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP*. Oncogene, 1998. **17**(8): p. 931-9.
370. Jung, Y.S., Y. Qian, and X. Chen, *Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity*. Cell Signal, 2010. **22**(7): p. 1003-12.
371. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell, 1993. **75**(4): p. 817-25.
372. Harper, J.W., et al., *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell, 1993. **75**(4): p. 805-16.
373. Rao, S., et al., *Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53*. Oncogene, 1998. **17**(18): p. 2393-402.
374. Macleod, K.F., et al., *p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage*. Genes Dev, 1995. **9**(8): p. 935-44.
375. Datto, M.B., et al., *Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5545-9.
376. Donato, N.J., et al., *EGF receptor and p21WAF1 expression are reciprocally altered as ME-180 cervical carcinoma cells progress from high to low cisplatin sensitivity*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(1): p. 193-202.
377. Rychahou, P.G., et al., *Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(51): p. 20315-20.
378. Rychahou, P.G., et al., *Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma*. Ann Surg, 2006. **243**(6): p. 833-42; discussion 843-4.
379. Han, Z., et al., *Akt1/protein kinase B alpha is involved in gastric cancer progression and cell proliferation*. Dig Dis Sci, 2008. **53**(7): p. 1801-10.
380. Roy, H.K., et al., *AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2002. **23**(1): p. 201-5.
381. Salmena, L., A. Carracedo, and P.P. Pandolfi, *Tenets of PTEN tumor suppression*. Cell, 2008. **133**(3): p. 403-14.
382. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
383. Kim, A.H., et al., *Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 893-901.
384. Heron-Milhavet, L., et al., *Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(22): p. 8267-80.
385. Testa, J.R. and A. Bellacosa, *AKT plays a central role in tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 10983-5.
386. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
387. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.

-
388. Beurel, E. and R.S. Jope, *The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways*. Prog Neurobiol, 2006. **79**(4): p. 173-89.
389. Bertout, J.A., S.A. Patel, and M.C. Simon, *The impact of O₂ availability on human cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(12): p. 967-75.
390. Li, J., N.W. Shworak, and M. Simons, *Increased responsiveness of hypoxic endothelial cells to FGF2 is mediated by HIF-1alpha-dependent regulation of enzymes involved in synthesis of heparan sulfate FGF2-binding sites*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 9): p. 1951-9.
391. Calvani, M., et al., *Hypoxic induction of an HIF-1alpha-dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2705-12.
392. Nogueira, V., et al., *Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis*. Cancer Cell, 2008. **14**(6): p. 458-70.
393. Greer, E.L. and A. Brunet, *FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression*. Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7410-25.
394. Los, M., et al., *Switching Akt: from survival signaling to deadly response*. Bioessays, 2009. **31**(5): p. 492-5.
395. Campisi, J., *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors*. Cell, 2005. **120**(4): p. 513-22.
396. Heinzlmann, S. and G. Bauer, *Multiple protective functions of catalase against intercellular apoptosis-inducing ROS signaling of human tumor cells*. Biol Chem, 2010. **391**(6): p. 675-93.
397. Bechtel, W. and G. Bauer, *Catalase protects tumor cells from apoptosis induction by intercellular ROS signaling*. Anticancer Res, 2009. **29**(11): p. 4541-57.
398. Yaginuma, Y. and H. Westphal, *Analysis of the p53 gene in human uterine carcinoma cell lines*. Cancer Res, 1991. **51**(24): p. 6506-9.
399. Coleman, A.B., *Positive and negative regulation of cellular sensitivity to anti-cancer drugs by FGF-2*. Drug Resist Updat, 2003. **6**(2): p. 85-94.
400. Gallo, D., et al., *Anti-tumour activity of a panel of taxanes toward a cellular model of human cervical cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2000. **45**(2): p. 127-32.
401. Ling, Y.H., N.J. Donato, and R. Perez-Soler, *Sensitivity to topoisomerase I inhibitors and cisplatin is associated with epidermal growth factor receptor expression in human cervical squamous carcinoma ME180 sublines*. Cancer Chemother Pharmacol, 2001. **47**(6): p. 473-80.
402. Fojo, T. and M. Menefee, *Mechanisms of multidrug resistance: the potential role of microtubule-stabilizing agents*. Ann Oncol, 2007. **18 Suppl 5**: p. v3-8.
403. Long, H.J., 3rd, *Management of metastatic cervical cancer: review of the literature*. J Clin Oncol, 2007. **25**(20): p. 2966-74.
404. Van Cutsem, E., et al., *Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **360**(14): p. 1408-17.
405. Chlebova, K., et al., *High molecular weight FGF2: the biology of a nuclear growth factor*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(2): p. 225-35.
406. Van den Berghe, L., et al., *FIF [fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-interacting-factor], a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF-2*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(11): p. 1709-24.

10 Publikationen und Teilnahme an Kongressen

10.1 Liste eigener Publikationen

Erschienen:

- **Schulze, D.** and Aigner, A.,
Nanosystems for the delivery of RNAi
in: "Therapeutic Ribonucleic Acids in Brain Tumors", Eds. V.A. Erdmann, G. Reifenberger, J. Barciszewski, Springer-Verlag (2009)
- Frömberg, A.; Gutsch, D.; **Schulze, D.**; Vollbracht, C.; Weiss, G.; Czubayko, F.; Aigner, A.,
Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs
Cancer Chemother. Pharmacol. (2010) [Epub ahead of print]

Eingereicht:

- **Schulze, D.**, Plohm P., Hobel S., Aigner, A.
Anti-tumor effects of fibroblast growth factor-binding protein (FGF-BP) knockdown in colon carcinoma are mediated through decreased proliferation and induction of apoptosis
J. Biol. Chem. (under review)

In Vorbereitung:

- **Schulze, D.**, Aigner, A.
Sensitivity of tumor cells towards anti-cancer drugs depends on FGF-BP expression
(In Vorbereitung für Biochem. Biophys. Res. Commun.)

10.2 Teilnahme an Kongressen und Poster-Präsentationen

- **Daniel Schulze**, Julia Hagenbusch, Shaker Abuharbeid, Frank Czubayko, and Achim Aigner,
Complex biochemical properties of a Fibroblast growth factor-binding protein (FGF-BP)
Poster-Präsentation im Rahmen der DGPT-Tagung (Deutsche Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie) in Mainz 2009

11 Curriculum vitae

■ Persönliche Daten

Name:	Daniel Schulze
Geburtstag:	05.04.1979
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Geburtsort:	Marburg

■ Schule und Studium

1985 - 1998	Schulzeit mit Abitur, Edertalgymnasium Frankenberg
1998 - 1999	Ausbildung zum Pharmazeutisch-technischen Angestellten, PTA-Schule Marburg
1999 - 2003	Studium der Pharmazie, Philipps-Universität Marburg
2001	6-wöchiges Praktikum „Protein-Reinigung“ (Aventis-Behring)
2002	Auslandssemester in Frankreich an der Université de Paris XI (Phytochemie, Biochemie) sowie 4-wöchiges Praktikum im Central-Hospital Claude-Bichat, Paris
2008	Zusatzqualifikation im Pharmarecht am FB Rechtswissenschaften, Philipps-Universität Marburg

■ Beruflicher Werdegang

10/2003 – 10/2004	Pharmaziepraktikum in der Gregorius Apotheke, Aachen und im Klinikum Garmisch-Partenkirchen
2004	Approbation als Apotheker
01/2005 - 05/2006	Apotheker in der Apotheke Hatzfeld und in der St. Elisabeth-Apotheke, Marburg
06/2006 - 06/2010	Promotionsstipendium am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, AG Prof. Dr. Aigner, finanziert durch die VFK Krebsforschung gGmbH <ul style="list-style-type: none">• Prüfungsbeisitzer im Staatsexamen für Pharmazeuten• Lehrtätigkeit (VL Pharmakologie für Zahnmediziner)• Betreuung von Hauptfachpraktikanten der Humanbiologie
seit 07/2010	Apotheker in der Apotheke Hatzfeld

12 Danksagung

Diese Arbeit konnte nur mit Hilfe vieler Menschen entstehen, welche mich auf direkte oder indirekte Weise unterstützt haben. Mein ausdrücklicher Dank gilt:

Prof. Dr. Achim Aigner für die interessante Aufgabenstellung, für die fortwährend geduldige Betreuung und seine stets konstruktive Unterstützung bei der Interpretation der Daten. Ohne seine Hilfe wäre diese Arbeit nicht gelungen.

Prof. Dr. Kissel für die Übernahme der Funktion des Erstgutachters und für seine Bereitschaft zur Annahme dieser Dissertation am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg.

Der *VFK Krebsforschung gGmbH* für die Finanzierung dieses Projekts.

Der gesamten *AG Aigner* für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die freundliche Aufnahme in den Laboralltag, insbesondere *Philipp Plohm* für die Entlastung durch die Übernahme des Projekts sowie das unermüdliche Korrekturlesen meiner Arbeit, *Marga Losekamp* und *Andrea Wüstenhagen*, deren Wissen und Können im Laboralltag von unschätzbarem Wert war, für die perfekte technische Assistenz und die Hilfeleistungen, *Michael Rabe* für die vielen inspirierenden Ideen und kritischen Fragen, *Daniela Gutsch* für die Einweisung am Durchflussszytometer sowie die Durchführung der ELISA-Messungen, *Ulrike Weirauch* und *Sabrina Höbel* für die Unterstützung bei der *in vivo*-Studie, und den zahlreichen „Hubi“-Praktikanten für ihr tatkräftiges Engagement und die fleißige Durchführung von unzähligen RNA-Präparationen.

Besonders möchte ich meiner Freundin *Lisa* danken, die mich zu jeder Zeit ermutigt hat und mir uneingeschränkt zur Seite stand. Außerdem danke ich *Franky*, der stets den lebenden Beweis dafür erbrachte, dass es immer eine Lösung gibt.

Nicht zuletzt gilt ein großer Dank meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützt haben und mir somit die notwendige Ruhe und Sicherheit für die Erstellung dieser Arbeit gaben.

Schließlich danke ich meinem Doktorvater Achim für die schöne gemeinsam verbrachte außeruniversitäre Zeit, geprägt durch unzählige „schnelle Bälle“ im Squash-Court.

... Der Punktestand lautet: 18 zu 2 für Achim; Daniel macht einen Punkt;

Achim: „So, jetzt treff ich mal wieder was ...“

13 Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

*Analyse biologischer Effekte eines Fibroblasten-Wachstumsfaktor-bindenden
Proteins (FGF-BP) in Tumoren über verschiedene Knockdown-Strategien*

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt bzw. die wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Doktorarbeit wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Marburg, den 01. Juli 2011

